

**SYNTHÈSE D'AGONISTES SÉLECTIFS DU RÉCEPTEUR OPIOÏDE DELTA. ÉVALUATION DE LEUR PROFILS
PHARMACOLOGIQUES POUR LE TRAITEMENT DE LA DOULEUR**

par

Jean-Louis Beaudreau

Thèse présentée au Département de chimie en vue
de l'obtention du grade de docteur ès sciences (Ph.D.)

FACULTÉ DES SCIENCES
UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE

Sherbrooke, Québec, Canada, Juillet 2018

Le 13 juillet 2018

*le jury a accepté la thèse de Monsieur Jean-Louis Beaudeau
dans sa version finale.*

Membres du jury

Professeur Yves Dory
Directeur de recherche
Département de chimie

Professeur Louis Gendron
Codirecteur de recherche
Département de Pharmacologie et Physiologie

Professeur Anne Marinier
Évaluateur externe
Université de Montréal

Professeur Claude Spino
Évaluateur interne
Département de Chimie

Professeur Éric Marsault
Évaluateur interne
Département de Pharmacologie et Physiologie

Professeur Pierre Harvey
Président-rapporteur
Département de chimie

SOMMAIRE

La douleur est un phénomène touchant tout en chacun, et son traitement relève une importance sociétale considérable. La plupart des traitements existants sont associés à de nombreux effets secondaires nocifs. Ainsi, cet ouvrage relate le développement, la synthèse et l'évaluation biologique de nouveaux composés peptidiques et peptidomimétiques visant sélectivement le récepteur opioïdérique Delta pour le traitement de la douleur chronique. Les ligands opioïdes endogènes, dont ces composés sont dérivés, bien qu'efficaces, possèdent de mauvais profils pharmacocinétiques. Afin de remédier à ce problème, plusieurs modifications ont été effectuées sur le squelette de la Leu-enképhaline. Ce travail est issu d'une collaboration entre le laboratoire du professeur Yves Dory pour la partie chimie et le laboratoire du professeur Louis Gendron pour la partie pharmacologie. Outre l'amélioration des propriétés pharmacocinétiques, l'amélioration de la sélectivité pour le récepteur DOPr et la compréhension des mécanismes régissant la reconnaissance moléculaire des ligands DOPr ont été des objectifs explorés lors de cette recherche.

Dans un premier temps, une introduction générale portant sur la douleur, les mécanismes la régissant, son traitement en clinique, les récepteurs opioïdes, et les pistes de recherches à l'étude, est présentée.

Le premier chapitre porte sur le remplacement des fonctions à chaque extrémité de la chaîne principale de la Leu-enképhaline par des fonctions isostères, et l'influence de celles-ci sur les propriétés biologiques.

Le deuxième chapitre s'attache à l'influence de l'introduction de substituants sur le cycle aromatique du résidu Phe⁴ de la Leu-enképhaline.

Le troisième chapitre s'intéresse au remplacement du pont disulfure de peptides cycliques dérivés de la Leu-Enképhaline, sélectifs au récepteur DOPr, par un pont triazole.

Finalement, le chapitre 4 explore de nouvelles modifications en position 2 et décrit le développement de radiotraceurs peptidiques pour l'étude des mécanismes de la douleur associés à la Leu-enképhaline.

Mots clés : Leu-Enképhaline, isostères, douleur, récepteur opioïdérique Delta, peptidomimétiques, macrocycles, radiotraceurs.

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, j'aimerais remercier le professeur Yves Dory pour m'avoir donné ma chance, en m'acceptant dans son laboratoire. Par sa supervision présente mais non contraignante, j'ai pu développer mes compétences scientifiques ainsi que mon indépendance professionnelle. Il m'a souvent encouragé à sortir de ma zone de confort et à travailler sur diverses thématiques de la chimie allant de la chimie supramoléculaire à la radiochimie, en passant par la chimie médicinale. Toujours réceptif aux idées de ses étudiants, il m'a donné l'occasion d'expérimenter mes propres hypothèses. La codirection du professeur Louis Gendron m'a quant à elle permis d'approfondir mes connaissances en pharmacologie et plus particulièrement sur le domaine de la douleur. Je tiens également à souligner leur soutien qui m'a permis à de nombreuses occasions d'aller présenter mes résultats lors de congrès provinciaux ou internationaux. Je veux aussi souligner l'apport de la professeure Brigitte Guérin au projet, ainsi que ses conseils éclairés.

Il va sans dire que tout cela aurait été impossible sans l'aide précieuse des différents assistants de recherche qui ont collaboré avec moi : Véronique Blais et Brian Holleran pour les tests pharmacologiques des différents composés. Je dois particulièrement une fière chandelle à Véronique pour les premières relectures de mon manuscrit, son travail acharné et sa bonne humeur quotidienne. Je dois aussi mentionner Sébastien Tremblay pour m'avoir appris les rudiments de la radiochimie et ses bons conseils, ainsi que Sophie Beauchemin pour son accompagnement au laboratoire lors des premières années de ma thèse. Même si je n'ai pas collaboré directement avec elle, Anna Kwiatkowska m'a été d'une aide inestimable concernant tous les aspects de la chimie peptidique.

Il me faut également souligner le soutien technique de nombreux professionnels de recherche. Annie Doucet pour l'UPLC, Luc Tremblay pour la RMN, Phillippe Venne et le personnel de Phenoswitch Biosciences pour la réalisation des masses exactes, René Gagnon pour la gestion du parc analytique au département chimie, toute l'équipe travaillant au cyclotron, ainsi que le personnel de soutien administratif du département chimie et de l'IPS.

La composante humaine étant indispensable pour la réalisation du doctorat, je tiens à remercier en particulier mes collègues de laboratoire, grâce à qui j'ai pu partager de nombreux bons moments au

laboratoire : Thomas Marmin, Hà Thi Thanh Dao, Arnaud Proteau-Gagné, Jean-Francois Nadon, Vahid Dianati, Hojat Seyed Jamali, Hui Xiao, Weizheng Fan, Yanan Zhu, Hué Thi Minh Tran, Alexandre Foh-Dion, Victoria Laroche, Dominique N'Dong, Laura Mourot, Pauline Navals et Niousha Nazari. La maîtrise de la chimie organique de Thomas m'a toujours impressionné et m'a été précieuse à mes débuts. J'ai apprécié les nombreuses discussions scientifiques ou autres que j'ai pu avoir avec Vahid. J'ai aimé les sorties en dehors du laboratoire avec Dominique, Pauline et Laura ainsi que leur bonne humeur communicative. Ils ont rendu toutes ces années beaucoup plus agréables à vivre.

La supervision de plusieurs stagiaires m'en a également beaucoup appris : Alexandre Vaillant, Richard Chamberland, Monica Desrochers, Edouard Caron-Duval, Florence Schmidt, Simon Deguines, Jérémie Chenail.

J'ai également passé de bons moments avec les étudiants du labo Gendron : Sébastien Grastilleur, Khaled Abdallah, Étienne St-Louis, Francis Bergeron, Sylvie Blouin.

Par son approche multidisciplinaire encourageant les échanges collaboratifs, étudier à l'IPS a vraiment été stimulant. Je tiens à remercier entre autres tous les membres du laboratoire d'Éric Marsault et Robert Day.

Je tiens aussi à remercier les membres de mon jury, pour avoir accepté de juger mes travaux de doctorat et leur contribution à la correction de ce manuscrit: Éric Marsault, Pierre Harvey, Anne Marinier, Claude Spino

Pour leur soutien financier sans qui aucun de ces projets n'aurait pu être mené à bien, il est essentiel que je remercie les différents organismes subventionnaires : CRSNG, IRSC et la compagnie Cyclenium Pharma.

Bien entendu, il est indispensable que je souligne l'aide inestimable fourni par mes proches. En particulier mes parents à qui je dois beaucoup. Leur soutien moral tout au long de mon parcours académique m'a été d'une grande aide. Les valeurs humaines et professionnelles qu'ils m'ont inculqué ont grandement contribué à ma réussite. Finalement, tout cela n'aurait pas été possible sans le soutien quotidien de Di, qui m'a été essentiel pour tenir jusqu'au bout de cette aventure scientifique et humaine.

TABLE DES MATIÈRES

SOMMAIRE	I
REMERCIEMENTS	III
TABLE DES MATIERES	V
LISTE DES ABREVIATIONS.....	IX
LISTE DES TABLEAUX.....	XIII
LISTE DES FIGURES.....	XV
LISTE DES ÉQUATIONS.....	XXII
LISTE DES SCHEMAS.....	XXIII
INTRODUCTION.....	1
I.1 La Douleur.....	2
I.1.1. Physiologie de la Douleur	3
I.1.2. La douleur inflammatoire et neuropathique.....	7
I.1.3. Traitements de la douleur en clinique	9
I.1.4 État de la recherche fondamentale dans le traitement de la douleur.	16
I.2 Les récepteurs opioïdes	18
I.2.1 Structure	21
I.2.2 Processus intracellulaires et mode d'action sur la douleur	33
I.2.3 Effets secondaires.	36
I.3. Les ligands opioïdes DOPr.....	38
I.3.1. Les ligands hétérocycliques DOPr.....	38
I.3.2. Les ligands endogènes DOPr	41
I.3.3. Les peptidomimétiques d'enképhalines	44
I.4.Travaux précédents sur le récepteur DOPr au labo Dory/Gendron.....	48
1.4.1. Problématique initiale.....	49
I.4.2. « Amide scan » de la Leu enképhaline	50
I.4.3 Étude de la chaîne latérale du 5 ^{ème} résidu.	54
I.4.3. Nouvelles stratégies de macrocyclisation de la Leu-Enképhaline	57
I.4.4. Présentation du sujet.	59
I.5. Méthodologie.....	62

1.5.1. Synthèse des composés de l'ouvrage	62
1.5.2. Affinité des ligands par radiocompétition	63
1.5.3. Mesure de l'efficacité biologique des composés par BRET	64
1.5.4. Pharmacocinétique	68
1.5.5 Modélisation.....	69
CHAPITRE 1 : MODIFICATIONS ISOSTERIQUES EN POSITION C-TERMINALE ET N-TERMINALE DE LA LEU-ENKEPHALINE.	70
1.1. Introduction.....	70
1.1.1. Les isostères d'acide carboxylique dans la littérature.....	70
1.1.2. Modifications en position N-terminale rapportées dans la littérature.	73
1.1.3 Proposition	74
1.2. Synthèse	76
1.2.1. Synthèse des Leucines-tétrazole.....	76
1.2.2. Synthèse peptidique sur phase solide et modification en N-terminale	77
1.3. Résultats biologiques et discussion des résultats.....	79
1.3.1. Affinité des peptides 1-8 sur MOPr/DOPr.....	79
1.3.2. Efficacité cellulaire des peptides 1-8.	80
1.3.3. Rationalisation des propriétés pharmacodynamiques par modélisation moléculaire. .	82
1.3. Propriétés pharmacocinétiques.....	85
1.3.1 Paramètres physico-chimiques.....	85
1.3.2 Stabilité plasmatique.	88
1.4. Conclusions et perspectives.....	90
CHAPITRE 2 : ETUDE DE STRUCTURE-ACTIVITE EN POSITION 4 DE LA LEU-ENKEPHALINE	95
2.1. Introduction.....	95
2.1.1 Exploration de Phe ⁴ dans la littérature.	95
2.1.2 Approche rationnelle en suivant le diagramme de Topliss.	98
2.2. Synthèse	102
2.3. Discussion.....	103
2.3.1 Propriétés pharmacodynamiques et progression selon l'arbre de Topliss (Figure 72)	103
2.3.2. Modélisation moléculaire.	109

2.3.3. Propriétés pharmacocinétiques.....	115
2.4 Conclusions et perspectives.....	116
CHAPITRE 3 : DEVELOPPEMENT ET CARACTERISATIONS D'ANALOGUES MACROCYCLIQUES DE LA LEU-ENKEPHALINE.....	119
3.1 Introduction.....	119
3.1.1. Stratégies de macrocyclisation.....	120
3.1.2. Analogues macrocycliques de peptides opioïdiques dans la littérature.....	122
3.2. Remplacement du pont disulfure.....	127
3.2.1. Problématique.....	127
3.2.2 Synthèse.....	131
3.2.3. Tests biologiques des composés 40, 41, 42, 43 et 45	134
3.2.4. Modélisation moléculaire.....	137
3.3. Conclusion.....	140
CHAPITRE 4 : INVESTIGATIONS COMPLEMENTAIRES EN POSITION 2 DE LA LEU- ENKEPHALINE ET CONCEPTION DE LIGANDS RADIOMARQUES AU FLUOR, POUR LE DIAGNOSTIC MEDICAL.....	144
4.1. Introduction.....	144
4.1.1. Les radioligands visant les récepteurs opioïdes dans la littérature.....	145
4.1.2. Travaux précédents au laboratoire et description du projet.....	146
4.2. Synthèse.....	150
4.3. Propriétés pharmacologiques des composés 55-58.....	153
4.3.1. Affinité et efficacité cellulaire.....	153
4.3.2. Modélisation moléculaire dans le récepteur DOPr.....	154
4.3.3. Propriétés pharmacocinétiques des molécules 56-58	155
4.4. Radiochimie.....	156
4.4.1. Synthèse par distillation du ligand prosthétique.....	157
4.4.2. Synthèse par formation <i>in situ</i> du triflate.....	161
4.5. Conclusion.....	164
CONCLUSION GENERALE.....	167
REFERENCES ET NOTES.....	174
ANNEXE 1 : PARTIE EXPERIMENTALE.....	205
Remarques générales.....	206

Modes opératoires (en anglais).....	208
ANNEXE 2 : SPECTRES DE RÉSONANCE MAGNÉTIQUE NUCLÉAIRE DES PROTONS.....	239
ANNEXE 3 : SPECTRES DE CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE A HAUTE PERFORMANCE DES PEPTIDES SYNTHÉTISÉS	280

LISTE DES ABRÉVIATIONS

a.a	Acide aminé
Ac	Acétyle
Ala (A)	Alanine
Alloc	Allyloxycarbonyl
cAMP	Adénosyne monophosphate cyclique
Ar	Aryle
Arg (R)	Arginine
Asn (N)	Asparagine
Asp (D)	Acide aspartique
AUC	Aire sous la courbe
BHE	Barrière hématoencéphalique
Bn	Benzyle
Boc	<i>tert</i> -Butoxycarbonyl
BRET	Bioluminescence Resonance Energy Transfer
Bz	Benzoyle
<i>n</i> Bu	<i>n</i> -butyle
<i>t</i> Bu	<i>tert</i> -butyle
cBz	Benzyloxycarbonyle
CCM	Chromatographie sur couche mince
ClogP	Log P calculé
COX	Cyclooxygénase
Cys (C)	Cystéine
d	Doublet
dd	Doublet de doublet
<i>o</i> -DCB	<i>ortho</i> -Dichlorobenzène
DCM	Dichlorométhane
DIBALH	Hydruure de diisobutylaluminium
DIC	Diisopropylcarbodiimide
DIPEA	Diisopropyléthylamine

DMF	Diméthylformamide
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DOPr	Récepteur opioïde delta
EC50	Concentration à laquelle on atteint 50 % de l'efficacité maximale
ECL	Boucle extracellulaire
EDCI	1-(3-diméthylaminopropyl)-3-éthylcarbodiimide
EDT	Éthanedithiol
EM	Endomorphine
ESI-MS	Spectrométrie de masse à ionisation par électronébuliseur (Electrospray Ionization)
Et	Éthyle
Fmoc	Fluorénylméthoxy-carbonyl
GABA	Acide γ -aminobutyrique
GDP	Guanosine diphosphate
GFP	Protéine fluorescente verte
Gln (Q)	Glutamine
Glu (E)	Acide glutamique
Gly (G)	Glycine
GTP	Guanosine triphosphate
Gua	Guanidyle
HATU	Hexafluorophosphate de O-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-N,N,N',N' -tétraméthyluronium
His (H)	Histidine
HOBt	Hydroxybenzotriazole
HPLC	Chromatographie phase liquide à haute performance
HRMS	Spectrométrie de masse à haute résolution
IASP	International association for the study of pain
IC50	Concentration pour laquelle 50 % des récepteurs sont occupés
ICL	Boucle intracellulaire
IFD	Induced Fit docking
Ile (I)	Isoleucine
IR	Infrarouge
KOPr	Récepteur opioïde kappa
Leu (L)	Leucine

LENK (LE)	Leu-Enképhaline
LogD _{7,4}	LogP effectué avec un tampon à pH = 7,4
LogP	Logarithme du coefficient de partition octanol/eau
Lys (K)	Lysine
m	Multiplet
Me	Méthyle
Met (M)	Méthionine
MOPr	Récepteur opioïde mu
MS	Spectrométrie de masse
NMM	N-Méthylmorpholine
NOESY	Nuclear Overhauser Effects Spectroscopy
NOPr	Récepteur opioïde à la nociceptine
NSAID	Anti-inflammatoire non-stéroïdien
Orn	Ornithine
PPS	Tampon phosphate salin
PDB	Protein Data Bank
Pd/C	Palladium sur charbon
Pen	Penicillamine
Pg	Prostaglandine
Ph	Phényle
Phe	Phénylalanine
ppm	Parties par millions
Pra	Propraglycine
Pro (P)	Proline
q	Quadruplet
RCPG	Récepteur couplé aux protéines G
RMN	Résonnance Magnétique Nucléaire
RT	Room température
s	Singulet
SEM	Erreur standard à la moyenne
Ser (S)	Sérine
SPPS	Synthèse peptidique en phase solide

SNC	Système nerveux central
TBAF	Fluorure de tétrabutylammonium
TBDPS	tert-Butyldiphénylsilyl
TES	Triéthylsilane
Tf	Trifyle
TFA	Acide trifluoroacétique
TIPS	Triisopropylsilyl
THF	Tétrahydrofurane
Thr (T)	Thréonine
TM	(domaine) transmembranaire
Tos	Tosylate
Trp (W)	Tryptophane
TRPV1	Récepteur transient au potentiel vanilloïde 1
Trt	Trityle
Tyr (Y)	Tyrosine
UPLC	Chromatographie phase liquide à ultra performance
UV	Ultraviolet
Val (V)	Valine

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Propriétés des différentes classes de fibres nerveuses	5
Tableau 2. Traitements antalgiques en fonction du niveau de douleur.....	10
Tableau 3. Résidus jugés important pour la sélectivité entre les récepteurs opioïdes	29
Tableau 4. Effets thérapeutiques et secondaires associés aux différentes classes de récepteur opioïdes.	36
Tableau 5. Résumé du caractère donneur/accepteur des amides de la Leu-enképhaline.....	53
Tableau 6. Conditions de réactions pour la formation du tétrazole.	76
Tableau 7. Affinité <i>in-vitro</i> des peptides 1-8	80
Tableau 8. Efficacité biologique <i>in-vitro</i> des peptides 1-8 sur la voie de signalisation EPAC.	81
Tableau 9. Efficacité biologique <i>in-vitro</i> des peptides 1-8 sur le recrutement de la β -arrestine.	82
Tableau 10. Paramètres pharmacocinétiques calculés et mesurés des peptides 1-8	87
Tableau 11. Stabilité plasmatique (<i>ex vivo</i>) des peptides 1, 2, 4, 5, 7, 8	88
Tableau 12. Propriétés pharmacodynamiques du peptides 1, 4 et 13	91
Tableau 12. Affinité <i>in-vitro</i> des peptides 1, 22-29	104
Tableau 13. Affinité <i>in-vitro</i> des peptides 26, 30-32	106
Tableau 14. Affinité <i>in-vitro</i> des peptides 33-35	107
Tableau 15. Affinité <i>in-vitro</i> du peptide 36	108
Tableau 16. Recrutement de la β -arrestine par les composés 1, 22-35	109
Tableau 17. Paramètres géométriques.....	111
Tableau 18. Paramètres physico-chimiques calculés et mesurés des peptides 1, 26, 30, 31 et 33	115
Tableau 19. Affinité des peptides 40-43 et 45 sur les récepteurs DOPr et MOPr.	135
Tableau 20. Efficacité biologique <i>in-vitro</i> des peptides 40-43 et 45 sur la voie de signalisation AMPc.	136
Tableau 21. Efficacité biologique <i>in-vitro</i> des peptides 40-43 et 45 sur le recrutement de la β -arrestine.	137
Tableau 22. Conditions de réactions pour la S-alkylation.	152
Tableau 23. Affinité et efficacité biologique des composés 56-58	153
Tableau 24. Valeurs de logD _{7,4} des peptides 56-58	156
Tableau 25. Conditions de réactions pour la S-alkylation du ligand obtenu par distillation.	159

Tableau 26. Conditions de réaction pour la S-alkylation du ligand obtenu par distillation dans la boucle HPLC.....	160
Tableau 27. Conditions de réactions pour la S-alkylation du ligand obtenu par SPE.	163
Tableau G.1 : Agents desséchants utilisés pour la distillation de différents solvants et réactifs.	206
Tableau A3.1. HPLC des peptides 2-8	281
Tableau A3.2. HPLC des peptides 22-36	286
Tableau A3.3. HPLC des peptides 40-43 et 45	295

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Réflexe nociceptif. <i>Image utilisée en accord de la licence CC BY-NC-ND 3.0 (Paternité-Pas d'utilisation commerciale-Pas de modifications)</i>	3
Figure 2. L'activation multimodale des différents récepteurs à la surface des nocicepteurs crée une dépolarisation membranaire (augmentation de Na ⁺ et K ⁺) et induit l'excitation du neurone afférent. (ASIC: <i>Acid-Sensing Ion Channel</i> ; TRP : <i>Transient Receptor Potential</i> ; MDEG : <i>Mammalian degenerin</i> ; P2X: <i>Purinoreceptor</i> ; ATP: <i>Adenosine TriPhosphate</i>).....	4
Figure 3. Les fibres nerveuses pénètrent plus ou moins profondément dans la moelle épinière, dépendamment de leurs catégories. Elles communiquent ensuite avec le second neurone via leurs deux synapses afin de prolonger la diffusion du signal électrique. <i>Image utilisée en accord de la licence Copyleft associée au contenu du site « Lecerveau à tous les niveaux »,²⁰ permettant la reproduction et la modification pour utilisation non commerciale.</i>	5
Figure 4. La libération de neurotransmetteurs suite à l'excitation du neurone afférent, permet d'établir la communication avec la deuxième synapse du neurone efférent, afin de communiquer le signal électrique vers le cerveau.	6
Figure 5. La « soupe inflammatoire », active plusieurs récepteurs transmembranaires à la surface du nerf périphérique. Les messagers intracellulaires relâchés induisent une diminution du seuil d'activation des récepteurs multimodaux, ainsi qu'une augmentation de leur population, avec pour conséquence une sensibilisation périphérique	8
Figure 6. La sensibilisation périphérique engendre une augmentation de neuropeptides relâchés à l'interneurone. La concentration élevée de Ca ²⁺ due à l'activation du récepteur NMDA, outre une augmentation de la dépolarisation, provoque une altération de l'expression des récepteurs à la surface du neurone afférent et une augmentation du signal douloureux.....	9
Figure 7. Structure chimique de plusieurs Anti-inflammatoires Non-Stéroïdiens (AINS) utilisés en clinique	11
Figure 8. Structure chimiques d'agonistes sélectifs de COX-2.....	12
Figure 9. Structure chimique de plusieurs opiacés utilisés en clinique.....	14
Figure 10. Structure chimiques d'autres classes de composés utilisés pour le traitement de la douleur neuropathique	15
Figure 11. Exemples de molécules pour les cibles alternatives de la douleur.	16

Figure 12. Structure chimiques de molécules ciblant les récepteurs sigma 1 (σ_1R) et d'antagoniste des récepteurs cannabinoïdes (CB2).....	17
Figure 13. Structure chimique des endomorphines 1 et 2, ligands sélectifs du récepteur MOPr.....	19
Figure 14. Structure chimique des enképhalines, ligands endogènes du récepteur DOPr.	19
Figure 15. Structure de la Dynorphine, ligand endogène du récepteur KOPr.....	20
Figure 16. Structure chimique de la Nociceptine, ligand endogène du récepteur NOP.....	20
Figure 17. Représentation des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG). (a) Composantes d'un RCPG. (b) Différentes familles de RCPG. Les zones jaunes représentent les sites de liaisons du ligand.	21
Figure 18. Cycle d'activation des protéines G trimériques (composées de leurs sous-unités α , β , γ)	23
Figure 19. Superposition des structures rayons X des récepteurs opioïdes MOPr (4DKL, en vert), DOPr (4N6H, en orange) et KOPr (4DJH, en violet). Par souci de clarté, seul le Naltrindole est représenté (en CPK) dans la cavité.	24
Figure 20. Concept « Message-Adresse ». (a) Schéma dans les récepteurs opioïdes ; (b) Concept appliqué à la Leu-Enképhaline, ligand endogène du récepteur DOPr.	25
Figure 21. Interactions moléculaires dans la partie message du récepteur DOPr (en bleu) avec l'antagoniste Naltrindole (en rose). Les résidus affichés sont conservés dans les trois récepteurs et noté selon les codes des résidus de DOPr.	26
Figure 22. Ligands sélectifs au récepteur MOPr et leur partie adresse.	27
Figure 23. Ligands sélectifs à DOPr et leurs composantes responsables de la sélectivité.....	27
Figure 24. Ligands sélectifs à KOPr et représentation de leurs composantes adresse.	28
Figure 25. Structure 3D de la partie adresse des récepteurs opioïdes liés à leur antagoniste respectif. (a) Naltrindole (rose) et β -FNA dans DOPr (Bleu) et MOPr (vert). (b) Naltrindole (rose) et JDtic (jaune) dans DOPr (bleu) et KOPr (orange). (c) β -FNA (violet) et Dmt-Tic-Phe-Phe-NH ₂ (jaune) dans DOPr (orange) et MOPr (vert). Les résidus sont notés selon la séquence de DOPr et entre parenthèse les mutations pour les autres récepteurs.....	30
Figure 26. Réarrangements intracellulaires suite à l'activation du récepteur par un agoniste. Les flèches indiquent le sens de déplacement des hélices. (a) Verrouillage de la conformation active (5C1M, violet) par des ponts salins entre Tyr ^{5.58} , Tyr ^{7.53} , Arg ^{3.50} et une molécule d'eau (sphère rouge). (b) Déplacement des hélices 3,5 et 6 par le réarrangement de Ile ^{3.40} , Phe ^{6.44} , et Pro ^{5.50} . (c) Réseau polaire impliqué dans le site orthostérique sodium (sphère violette) du récepteur DOPr inactif (4N6H, bleu), détruit lors de l'activation des récepteurs opioïdes	32

Figure 27. Signal intracellulaire amenant au blocage du signal de la douleur, suite à l'activation des récepteurs opioïdes	34
Figure 28. Mécanisme de désensibilisation du récepteur suite à l'activation du récepteur.	35
Figure 29. Structure chimique du lopéramide. Agoniste Mu dépourvu d'action centrale, utilisée pour le traitement de la diarrhée.....	37
Figure 30. Structure chimique de petits ligands sélectif au récepteur DOPr.	39
Figure 31. MDAN-21, agent bivalent MOPr/DOPr	40
Figure 32. Le motif Dmt-Tic pour la mise au point d'agent polyvalent MOPr/DOPr.....	41
Figure 33. Structure chimiques de plusieurs peptides endogènes (humain ou animal) sélectifs au récepteur DOPr.....	42
Figure 34. Résumé des différentes approches de peptidomimétisme. La Leu-Enképhaline est représentée à titre d'exemple.....	45
Figure 35. Structures chimiques de quelques peptidomimes linéaires de la Leu-Enképhaline	46
Figure 36. Structures chimiques de quelques analogues cycliques de la Leu-Enképhaline.....	48
Figure 37. Structure 3D de la Leu-enképhaline. Forme étendue (en rose), repliée (en vert), doublement repliée (en marron)	50
Figure 38. Caractère donneur et/ou accepteur de pont-H des différents isostères d'amides.....	51
Figure 39. Résumé des différentes modifications d'amides de la Leu-Enképhaline et leur influence sur l'affinité pour DOPr.	52
Figure 40. Structures de la Leu-Enképhaline amarrée dans le récepteurs DOPr, ayant obtenues les meilleurs scores d'Induced Fit Docking (IFD) et leurs énergies calculées par mécanique moléculaire (OPLS) ou par méthode DFT (MO6-2X).....	53
Figure 41. Structure active proposée de la Leu-Enképhaline et son schéma d'interactions avec le récepteur DOPr.....	54
Figure 42. acides aminés utilisés en remplacement de la Leucine en position 5 de la Leu-enképhaline	55
Figure 43. Pharmacophore du cinquième résidu de la Leu-enképhaline	56
Figure 44. Rigidification de la forme active supposée de la Leu-enképhaline par un espaceur éthylène	58
Figure 45. Perspectives envisageable pour la rigidification entre les deux noyaux aromatiques de la Leu-enképhaline.....	59
Figure 46. Modifications étudiées sur la Leu-Enképhaline par le laboratoire (en rouge), remportées dans la littérature (en bleu).	60

Schéma 3	63
Figure 47. courbe de compétition entre un ligand et une molécule radiomarquée.	64
Figure 48. Effets biologiques possibles suite à la liaison d'un ligand sur son récepteur.	65
Figure 49. Principe de la technique de Bioluminescence par Résonance de Transfert d'Énergie (BRET)	66
Figure 50. Mesure par BRET du recrutement de Gi consécutif à l'activation du récepteur.	67
Figure 51. Mesure par BRET du recrutement de la β -arrestine suite à l'activation du récepteur.....	67
Figure 52. Exemples d'isostères d'acides carboxylique (a) acyliques ou (b) cycliques. Les valeurs de pKa et de logD ont été calculées à partir des outils de la suite logicielle ChemAxon, en prenant R = CH ₃	71
Figure 53. Les deux tautomères du tétrazole à l'équilibre et leurs possibles liaisons avec le récepteur DOPr.....	72
Figure 54. Structures chimiques de peptides opioïdes possédant une amine quaternaire (gauche) et de leur analogues ayant subis une guanidylation en position N-terminal (droite).....	73
Figure 55. Structures chimiques des composés cibles portant une, deux ou trois altérations en position 1, 2 ou 5 de la Leu-enképhaline.	75
Figure 56. Modélisation moléculaire des différentes modifications sur le récepteur DOPr (4N6H). (a) Leu-enképhaline (composé 1) ; (b) Leu-enképhaline-tétrazole (composé 2) ; (c) Guanidyl-Leu- enképhaline (composé 4) ; (d) D-Alanine-Leu-enképhaline-tétrazole (composé 7). Les liaisons hydrogènes formées entre le ligand et le récepteur sont représentées par des pointillés jaune.....	83
Figure 57. Modélisation moléculaire des composés (a) D-Leu-enképhaline tétrazole (composé 3) ; (b) D- Ala ² -D-Leu ⁵ -enképhaline-tétrazole (composé 6) sur le récepteur DOPr (4N6H).....	84
Figure 58. Modélisation moléculaire des composés (a) Guanidyl-Leu-enképhaline-tétrazole (composé 5) ; (b) Gua-D-Ala ² -D-Leu ⁵ -enképhaline-tétrazole (composé 8) sur le récepteur DOPr (4N6H). ..	85
Figure 59. Coefficient de partition des composés 1-8	86
Figure 60. Stabilité (<i>ex vivo</i>) plasmatique des peptides 1, 2, 4, 5, 7 et 8 à 37 °C.	89
Figure 61. Recrutement de la β -arrestine du composé 13 sur le récepteur MOPr (a) ou le récepteur DOPr (b) Docking induit du composé 13 dans le récepteur DOPr 4N6H (c)	92
Figure 62. Proposition de développement de la série.....	93
Figure 63. Équilibre tautomérique à pH 7,4 du (a) tétrazole (b) 5-oxo-1,2,4-oxadiazole. Les populations relatives ont été calculé avec la suite logicielle Chemaxon.	93

Figure 64. Docking induit de la molécule proposée Leu-Enképhaline-5-oxo-1,2,4-oxadiazole dans le récepteur DOPr 4N6H.....	94
Figure 65. Les conformations du DADLE (a) et de la Leu-enképhaline (b) en phase gazeuse, semblent suggérer que la proximité spatiale des noyaux aryles favorise la sélectivité pour DOPr. ²⁵³	95
Figure 66. La nitration en para de Phe ⁴ sur la Leu-enképhaline et la dynorphine se traduit de façon différente au niveau l'efficacité biologique pour MOPr et DOPr.	96
Figure 67. L'halogénéation de Phe ⁴ modifie la liaison de la Leu-enképhaline selon deux modes différents : Formation d'une liaison hydrogène en position <i>para</i> (a) ou formation d'une liaison halogène en <i>ortho</i> (b) avec le squelette du récepteur DOPr.	97
Figure 68. Arbre décisionnel de Topliss.	99
Figure 69. Décision lorsque l'activité du composé 4-Cl est supérieure à celle du composé parent.	100
Figure 70. Décision lorsque l'activité du composé 4-Cl est similaire à celle du composé parent.	100
Figure 71. Décision lorsque l'activité du composé 4-Cl est inférieure à celle du composé parent.	101
Figure 72. Première phase exploratoire.....	104
Figure 73. Étude complémentaire en position méta.	105
Figure 74. Exploration complémentaire en position para de Phe ⁴	106
Figure 75. Insertion d'un deuxième noyau phényle en position β de la phénylalanine, afin de maximiser l'occupation du récepteur DOPr.....	108
Figure 76. Docking induit dans le récepteur DOPr 4N6H des composés (a) 3-Cl (26), (b) 3-Br (30), (c) 3-I (31), (d) 4-F (33).....	110
Figure 77. Docking induit (MOE) des composés (a) 3,5-Cl ₂ (29) et (b) 3,4-Cl ₂ (25), dans le récepteur DOPr 4N6H.	111
Figure 78. Docking induit (MOE) des composés (a) 3-Me (32), (b) 4-Me (24), (c) 3-CF ₃ (27) et (d) 4-CF ₃ (34), dans le récepteur DOPr 4N6H.	112
Figure 79. Docking induit (MOE) des composés (a) 4-NO ₂ (35), (b) 3-NO ₂ (28), dans le récepteur DOPr 4N6H.	113
Figure 80. Docking induit (MOE) des composés (a) 4-Cl (22), (b) 4-OMe (23), dans le récepteur DOPr 4N6H.	114
Figure 81. Superposition des peptides 1 , 22-35 (a) et des peptides 24 et 30 (b).....	114
Figure 82. Structure chimique des composés 37-39	117
Figure 83. Docking induit (MOE) des composés (a) 38 , (b) 39 , dans le récepteur DOPr 4N6H.....	118

Figure 84. Changement conformationnel d'un macrocycle lorsqu'il passe d'un milieu aqueux à un milieu lipophile.....	119
Figure 85. Stratégies de macrocyclisation utilisées en chimie médicinale.	121
Figure 86. (a) Acides aminés utilisés pour la macrolactamisation. (b) Acides aminés pour la cyclisation via un pont disulfures.	122
Figure 87. Structures chimiques d'analogues cycliques de la Dynorphine en <i>N</i> -terminal, (a) directement entre l'amine de Tyr et l'acide glutamique, ou (b) entre l'amine de Tyr et la lysine à l'aide d'un espaceur acétate (N-CH ₂ -CO-).	123
Figure 88. Structures chimiques de composés macrocycliques dérivés de l'endomorphine et dépourvus de sites cationisables (a). La modification de la nature et/ou de la taille de l'espaceur permet de moduler l'affinité pour les différents récepteurs opioïdes	124
Figure 89. (a) La cyclisation en C-terminal de la morphiceptine renforce la sélectivité pour MOPr, (b) tandis qu'elle convertit la Leu-Enképhaline en agoniste DOPr.	125
Figure 90. Structures chimiques de peptides opioïdes macrocycliques via lactamisation entre chaînes latérales.....	126
Figure 91. Structures chimiques de molécules où le pont disulfure a été remplacé par (a) un thioéther, (b) un pont dicarba ou (c) par un espaceur benzyle.	127
Figure 92. Le pont disulfure comparé aux deux isoformes de triazole (a). Obtention des deux isomères de triazoles à partir du même précurseur, en fonction du catalyseur utilisé.	129
Figure 93. Structure chimique des analogues proposés de DPDPE et JOM-13, portant un triazole en place du pont disulfure.....	130
Figure 94. Spectres HPLC du peptide linéaire 40 (a), du macrocycle 41 obtenu par CuAAC (b), du macrocycle 42 obtenu par RuAAC (c), du peptide linéaire 43 (d), du macrocycle 45 obtenu par RuAAC (d)	133
Figure 95. Docking induit (MOE) dans le récepteur DOPr 4N6H, des composés dérivés de la DPDPE. (a) Forme linéaire 40 , (b) cyclique 1,4-triazole 41 et (c) cyclique 1,5-triazole 42	138
Figure 96. Docking induit (MOE) dans le récepteur DOPr 4N6H, des analogues de JOM-13. Forme linéaire 43 (a) et cyclique 1,5-triazole 45 (b).	139
Figure 97. Augmentation de la taille du cycle d'un carbone pour former le macrocycle 46 (a), et son docking induit dans le récepteur DOPr 4N6H (b), ainsi que sa superposition avec le macrocycle 42 (c).	141

Figure 98. L'ajout d'un groupement gem-diméthyle en position α du noyau triazole pourrait augmenter la sélectivité du macrocycle 47 (a), et son docking induit (MOE) dans le récepteur DOPr 4N6H (b), ainsi que sa superposition avec le macrocycle 43 (en marron) (c).....	142
Figure 99. Radiotraceurs des différents récepteurs opioïdes développés.....	146
Figure 100. Peptide marqué au cuivre 64 récemment développé au laboratoire (haut). Autoradiographie de coupes de cerveaux de rat sur lesquels ont été infusés une solution du peptide radiomarqué (bas). ³⁷⁰	147
Figure 101. Série d'analogues de la Leu-Enképhaline portant une cystéine méthylée en position 2. ..	148
Figure 102 : Série d'analogues de la Leu-Enképhaline portant une cystéine méthylée en position 2. .	149
Figure 102. Introduction de chaînes fluoroalcanes de tailles variables sur la séquence de la Leu-enképhaline modifiée.	149
Figure 104. Docking induit (MOE) des peptides 56 (a) et 57 (b) dans la structure cristallographique 4N6H du récepteur DOPr.....	154
Figure 105. Docking induit (MOE) des peptides 58 dans la structure cristallographique 4N6H du récepteur DOPr.....	155
Figure 106. Structures chimiques des composés 70-73	165
Figure 107. Structures chimiques des composés 74 et 75	166
Figure 108. Résumé des travaux effectués au cours de cette thèse.....	167
Figure 109. Molécules d'intérêt issues du chapitre 1.....	168
Figure 110. Molécules d'intérêt issues du chapitre 2.....	169
Figure 111. Molécules d'intérêt issues du chapitre 3.....	170
Figure 112. Molécules d'intérêt issues du chapitre 4.....	171
Figure 113. Exemples de combinaisons possibles.	172

LISTE DES ÉQUATIONS

Équation 1

99

LISTE DES SCHÉMAS

Schéma 1.	7
Schéma 2.	57
Schéma 4.	76
Schéma 5.	77
Schéma 6.	78
Schéma 7.	94
Schéma 8.	102
Schéma 9.	103
Schéma 10.	131
Schéma 11.	132
Schéma 12.	134
Schéma 13.	143
Schéma 14.	145
Schéma 15.	150
Schéma 16.	151
Schéma 17.	157
Schéma 18.	158
Schéma 19.	159
Schéma 20.	161
Schéma 21.	162
Schéma 22.	163

INTRODUCTION

Le traitement de la douleur est au cœur des préoccupations de l'être humain depuis des millénaires. En effet, différentes sources historiques démontrent l'utilisation de l'opium par différentes sociétés antiques (égyptiennes, grecques, sumériennes), pour ses propriétés sédatives et antalgiques.¹ Ce n'est seulement qu'en 1804 que son principe actif, la morphine est découverte, nommée d'après le dieu des songes de la Grèce antique, Morphée, dû à ses effets secondaires de somnolence.² La morphine sera ensuite progressivement intégrée dans les procédures médicales au cours du XIXe siècle, notamment grâce à sa forme injectable qui rendit possible son utilisation massive tant à l'hôpital que sur les champs de bataille. On verra apparaître la « maladie du soldat » et la « morphinomanie » après son utilisation massive et abusive.³ Prohibée dans la première partie du XX siècle, elle retrouvera un intérêt thérapeutique à partir des années 1950, pour soulager les souffrances en fin de vie.⁴ La structure chimique de la morphine quant à elle, ne sera découverte qu'en 1923.⁵ Bien qu'il soit possible de synthétiser la morphine,⁶ sa complexité structurale fait que l'extraction de l'opium lui est préférée.⁷ À partir des années 70 et 80, les scientifiques commencèrent à mieux comprendre le fonctionnement de la douleur.

Ainsi cet ouvrage porte davantage sur le développement de nouveaux composés antalgiques, plus qu'il ne s'intéresse au traitement de la douleur en soi. Toutefois, afin de mieux comprendre le projet, il est d'abord essentiel de s'intéresser à ce qu'est la douleur, puis son fonctionnement, les traitements utilisés en clinique, et les raisons qui font du récepteur opioïde Delta une cible de choix. La description des précédents travaux dans notre laboratoire permettra ensuite de situer le projet dans son contexte. Finalement, une brève description des méthodologies adoptées sera faite.

I.1 La Douleur

La douleur est un phénomène physiologique partagé par tous et a été défini en 1979 par l'IASP (International Association Study of Pain) de la façon suivante: «La douleur est une expérience sensorielle et émotionnelle désagréable, liée à une lésion tissulaire réelle ou potentielle, ou décrite en termes d'une telle lésion».⁸ Cette douleur est un phénomène naturel et essentiel à notre survie, afin de prévenir l'organisme d'une situation anormale, potentiellement dangereuse voir létale (blessure, maladie, ...).⁹

Étant une expérience subjective, elle est plutôt difficile à évaluer, et il convient de prendre en compte les différentes constituantes de cette douleur. Premièrement, l'aspect neurophysiologique, les stimuli nociceptifs, et la façon dont le cerveau traite le signal de la douleur, auxquels nous nous attarderons plus en détail au cours du manuscrit. Dans un second temps, la composante affective. Ainsi lors de l'évaluation de la douleur, les paramètres suivants seront pris en compte: région impliquée, durée, fréquence, intensité.¹⁰ Pour cela différents protocoles ont été mis au point, dont l'échelle de 1 à 10 qui reste la technique la plus utilisée en clinique.¹¹

On peut classer la douleur en deux catégories : aiguë ou chronique. Dans le cas de la douleur aiguë, elle tend à diminuer une fois la source de la douleur écartée, et disparaît une fois les lésions tissulaires guéries, aidée de traitements analgésiques au besoin.¹² Cependant, elle peut durer plus longtemps que la durée anticipée (généralement au-delà de trois mois) et devient alors chronique, ayant comme résultat une baisse significative de la qualité de vie chez les patients.¹³ En effet, en plus de la douleur en soi, les individus touchés souffrent souvent de dépression, d'anxiété ou de troubles du sommeil.¹⁴ Il a été évalué que la douleur représente un coût de plus de 600 milliard de dollars annuellement dans le monde, tant en coûts médicaux, qu'en baisse de productivité.¹⁵ À cela s'ajoute l'aspect sociétal, avec la montée de l'addiction aux antidouleurs qui grimpe d'année en année dans les sociétés occidentales, menant à une augmentation du taux de mortalité.¹⁶ Tous les éléments exposés précédemment montrent qu'il est impératif de trouver des traitements efficaces exempts d'effets secondaires, contre la douleur.

I.1.1. Physiologie de la Douleur

Le mécanisme de signalisation de la douleur peut être séparé en deux grands axes :

- la voie ascendante responsable de la transmission du signal nociceptif depuis les tissus périphériques, cheminant le long des fibres nerveuses jusqu'aux différentes zones concernées du système nerveux central (hypothalamus, cortex cérébral, thalamus). Le signal reçu est alors analysé et traité.
- La voie descendante est ensuite amorcée afin d'envoyer une réponse comportementale nécessaire, afin de contrecarrer le phénomène responsable de la douleur (i.e. retirer sa main d'une plaque chauffante, **Figure 1**).¹⁷ Lors de cette étape, différents processus sont également mis en œuvre afin de moduler la douleur d'un point de vue physiologique.

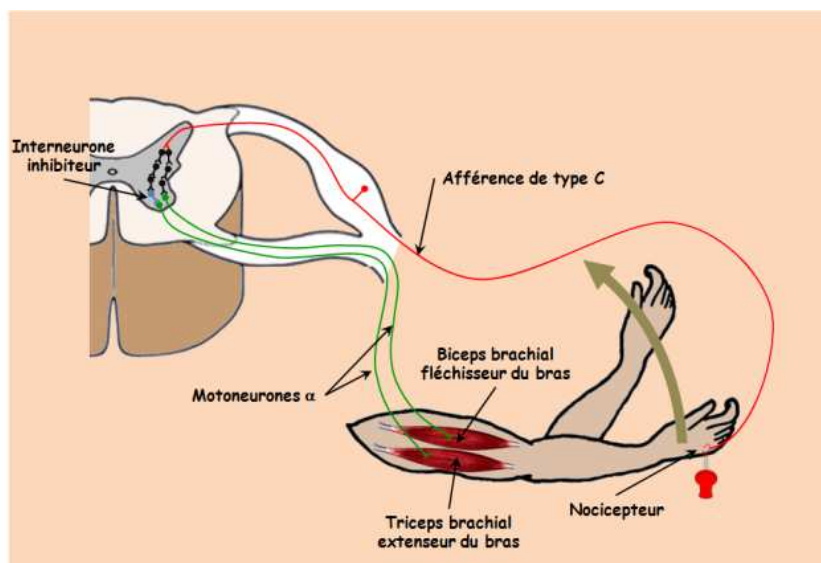


Figure 1. Réflexe nociceptif.¹⁷ Image utilisée en accord de la licence CC BY-NC-ND 3.0 (Paternité-Pas d'utilisation commerciale-Pas de modifications)

Les différents organes de notre corps, tels que la peau, les muscles et les viscères, qui constituent le système périphérique sont innervés par de petites fibres sensibles, dont chacune est pourvue de terminaisons libres appelées nocicepteurs (**Figure 2**). À la suite de stimuli chimiques, thermiques ou mécaniques, différents récepteurs à leur surface (TRPV1, TRPM8, ASIC, MDEG) sont activés.¹⁸ Plusieurs médiateurs chimiques sont alors relâchés, résultant en l'ouverture des canaux sodiques Nav et la fermeture des canaux potassiques Kv, ce qui se traduit par une augmentation de la concentration en

sodium et potassium, créant une dépolarisation de la membrane. Cette dépolarisation va par la suite engendrer une augmentation du potentiel d'action (excitation) qui va se propager le long des fibres nerveuses.

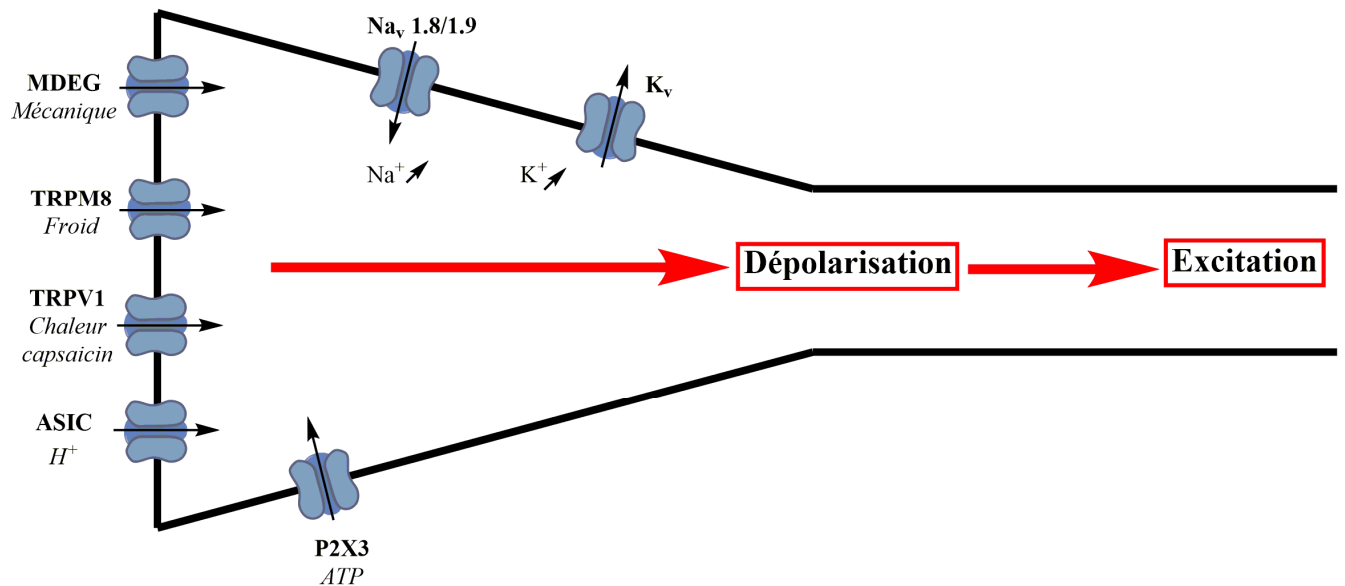


Figure 2. L'activation multimodale des différents récepteurs à la surface des nocicepteurs crée une dépolarisation membranaire (augmentation de Na^+ et K^+) et induit l'excitation du neurone afférent.

(ASIC: Acid-Sensing Ion Channel ; TRP : Transient Receptor Potential ; MDEG : Mammalian degenerin ; P2X: Purinoceptor; ATP: Adenosine TriPhosphate)

Bien que ces nocicepteurs soient polymodaux et puissent être activés par différents stimuli à la fois, leur répartition homogène dans la peau, permet une bonne localisation de la douleur. En revanche cette distribution est moins conservée dans les autres tissus, ce qui rend plus problématique l'interprétation de la douleur. Ces fibres nerveuses responsables du transport du signal nociceptif et qui constituent le premier neurone, existent en différentes sous-catégories (**Tableau 1**) dépendamment de leur diamètre et de leur degré de myélinisation (tous deux corrélés et responsables de la vitesse du signal). La plupart des fibres démyélinisées (C), à très petit diamètre et à conduction très lente sont associées aux terminaisons polymodales et produisent une douleur sourde et diffuse (plutôt de type viscéral), tandis que les fibres myélinisées Aδ de petit diamètre et à conduction plus rapide, produisent une douleur plus vive et précise, similaire à une piqûre.¹⁹

Tableau 1. Propriétés des différentes classes de fibres nerveuses

Type de Fibre	A α	A β	A δ	C
Diamètre (μm)	13-20	6-12	1-5	0,2-1,5
Vitesse (m/s)	80-120	35-75	5-30	0,5-2
Récepteurs sensoriels	Muscles squelettiques	Mécanocapteurs de la peau	Douleur, température	Douleur, température, démangeaison

Leurs corps cellulaires se trouvent dans les ganglions rachidiens, et la plupart d'entre elles pénètrent dans la moelle épinière par la racine postérieure et se distribuent de façon très précise à plusieurs niveaux en fonction de leurs catégories (**Figure 3**).²⁰ Les fibres de gros calibres (A α , β) pénètrent plus profondément dans la moelle épinière et vont communiquer au passage avec des axones « collatéraux », permettant la connexion avec les neurones moteurs responsables du réflexe de retrait.

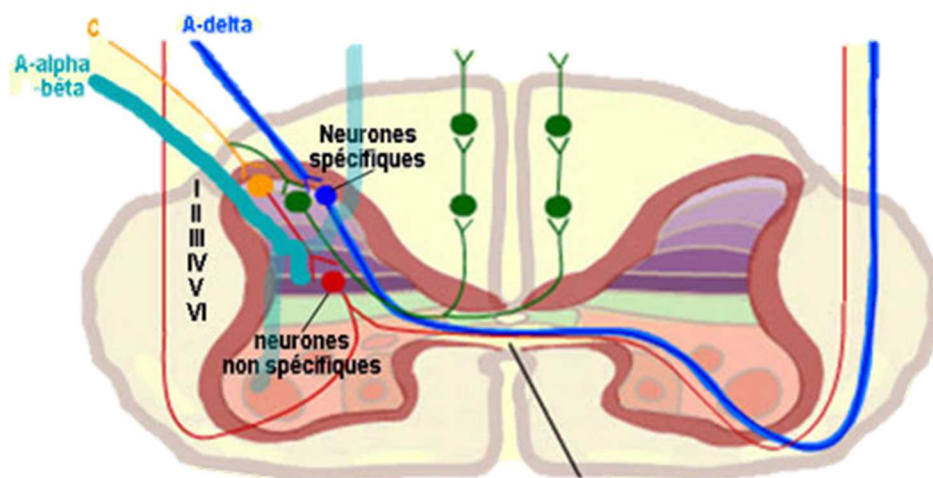


Figure 3. Les fibres nerveuses pénètrent plus ou moins profondément dans la moelle épinière, dépendamment de leurs catégories. Elles communiquent ensuite avec le second neurone via leurs deux synapses afin de prolonger la diffusion du signal électrique. *Image utilisée en accord de la licence Copyleft associée au contenu du site « Lecerveau à tous les niveaux »,²⁰ permettant la reproduction et la modification pour utilisation non commerciale.*

Les différentes fibres communiquent alors avec le deuxième neurone via leurs synapses. Cette connexion synaptique s'établit par l'intermédiaire de neurotransmetteurs (**Figure 4**). Le premier groupe de neurotransmetteur dit « classique » comprend la sérotonine, l'aspartate, tandis que le deuxième groupe comprenant les neuropeptides, possède une vingtaine de peptides.^{21,22} Le rôle respectif de chacun de ces transmetteurs dans la transmission de la douleur est encore largement à déterminer, toutefois la substance P, un peptide de 11 acides aminés, et le glutamate semblent être les substances les plus impliquées dans la transmission de la douleur chronique et aiguë respectivement.²³

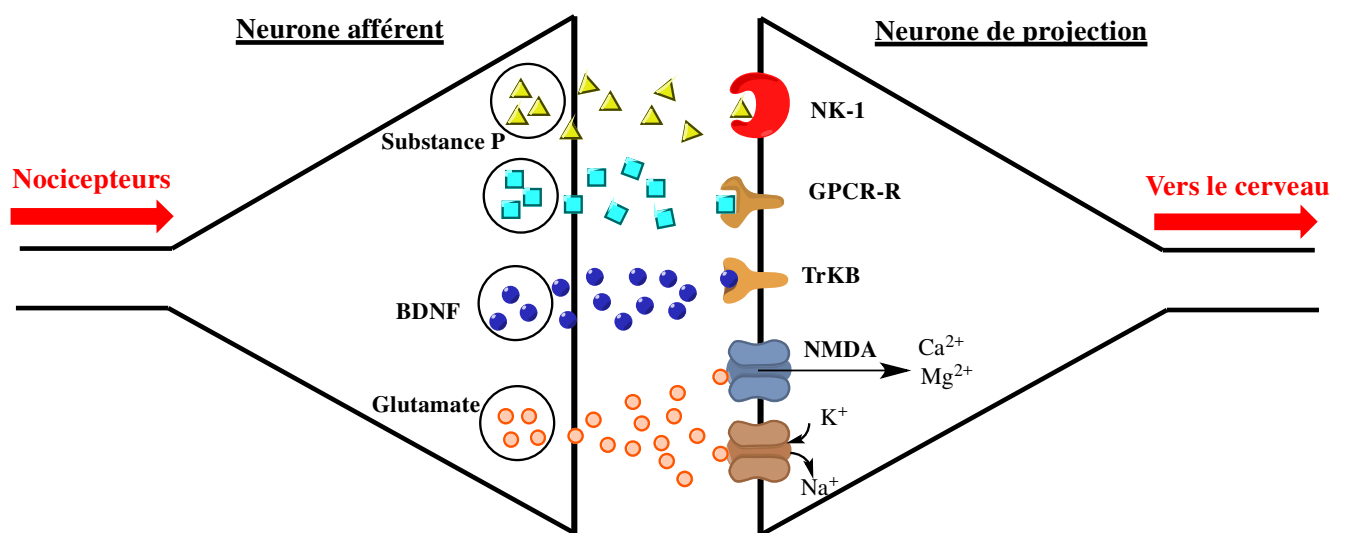


Figure 4. La libération de neurotransmetteurs suite à l'excitation du neurone afférent, permet d'établir la communication avec la deuxième synapse du neurone efférent, afin de communiquer le signal électrique vers le cerveau.

Une fois cette connexion établie, le signal électrique remonte jusqu'aux centres supérieurs du système nerveux central (hypothalamus, cortex sensitif).¹⁹ Le cerveau intègre alors le message de douleur, et envoie la réponse adéquate via la voie descendante. Cette réponse est divisée en deux parties : d'une part l'envoi d'une réponse via les interneurones de la moelle épinière communiquant avec les muscles afin de s'éloigner de la source nociceptive; dans un second temps, modulation de la douleur par production dans la substance périaqueducale de peptides endogènes opioïdes (enképhalines, dynorphines, endomorphine) ou de sérotonine, qui vont repotentialiser le signal électrique de la douleur (**Schéma 1**). Ils agissent également sur le neurone afférent, en empêchant la production des neuropeptides nociceptifs responsables de l'excitation du neurone transmetteur.²⁴

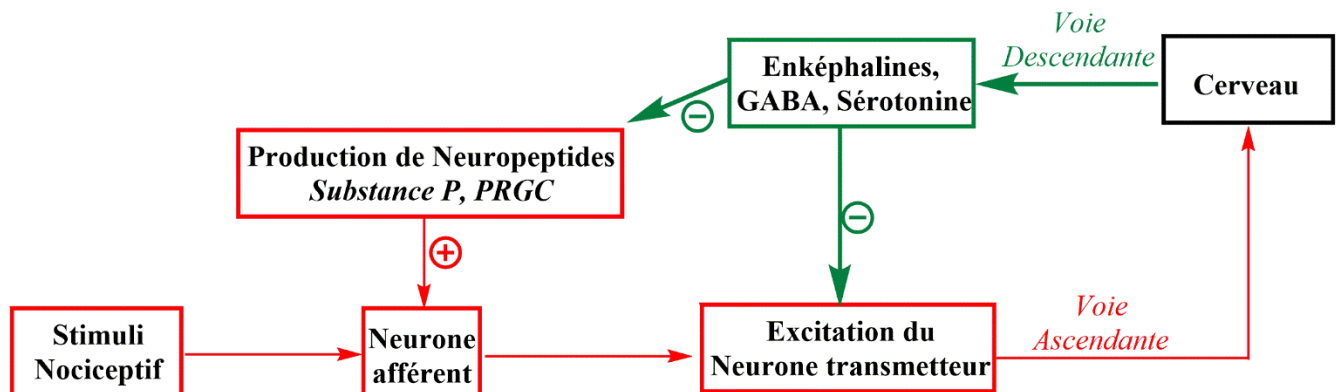


Schéma 1.

I.1.2. La douleur inflammatoire et neuropathique

Le paragraphe précédent décrit le fonctionnement normal de la douleur, toutefois ces mécanismes peuvent se trouver déréglés, et la douleur devient alors neuropathique. La douleur neuropathique est une condition thérapeutique handicapante (diminution de la qualité de vie), touchant plusieurs millions de personnes dans le monde.²⁵ Elle se manifeste par une réponse anormale du système nerveux au signal de douleur. Elle survient en général après une blessure, une lésion nerveuse périphérique, un trouble neurologique (ischémie), à la prise de médicaments, ou peut être liée à une maladie chronique (cancer, HIV, diabète ...).^{26,27,28} Elle se présente sous différentes formes telles que l'hyperalgésie (réponse exagérée aux signaux nociceptifs), l'allodynie (réponse anormale à des stimuli non nociceptifs, *i.e.* chaleur, froid, toucher), une douleur sourde et des troubles du sommeil.²⁹ Les traitements analgésiques classiques répondent peu à ce type de douleur.³⁰ Les mécanismes régissant cette pathologie sont encore mal compris, mais seraient en partie dus à une surexpression neuronale, créant des « courts circuits » dans le système messager de la douleur, et par conséquent le recrutement de fibres nerveuses normalement non associées à la douleur, menant à ces signaux anormaux (allodynie).

Cette surexcitation neuronale est le résultat des phénomènes de sensibilisation périphérique et centrale.^{24,31} Au niveau périphérique, lors d'une lésion ou d'une condition pathologique, divers facteurs endogènes sont libérés par les cellules immunitaires. Ceux-ci vont alors s'accumuler et induire une activation excessive des récepteurs à la surface des fibres nerveuses, en diminuant leur seuil d'activation. L'ensemble de ces modulateurs est communément appelé « soupe inflammatoire » et rassemble des

neuropeptides (bradykinine), les neurotrophines (facteur de croissance nerveuse NGF), les cytokines (interleukines, facteur de croissance tumorale TNF), les eicosanoïdes (prostaglandines, leukotriènes), et les chimiokines (CXCR4). La présence de ces molécules a pour conséquence d'activer leurs récepteurs respectifs présents à la surface de la plupart des nocicepteurs, qui à leur tour vont activer plusieurs kinases (PKC, PKA, MAPK). Ces kinases vont ensuite augmenter l'expression et la transduction des récepteurs de la douleur (TRPs, ASICs), ainsi que la conduction des canaux tensiodépendants Na_v et créer le phénomène d'hyperexcitabilité.¹⁹

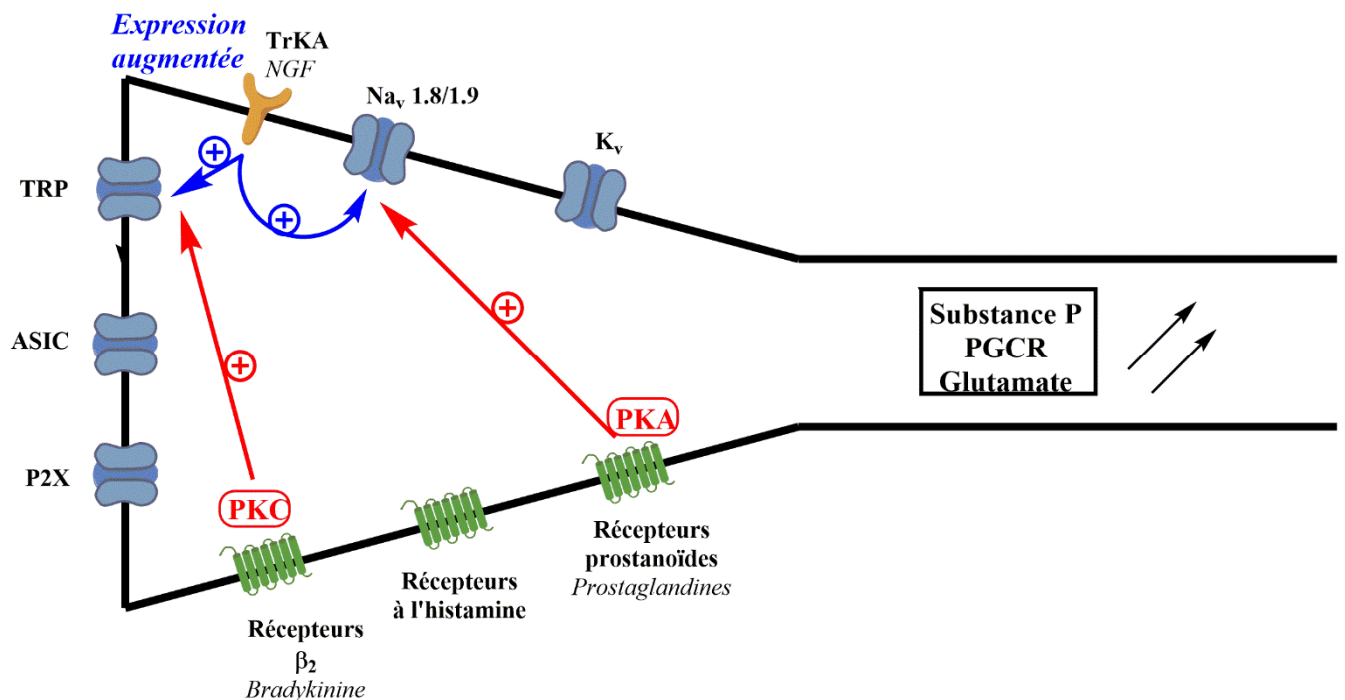


Figure 5. La « soupe inflammatoire », active plusieurs récepteurs transmembranaires à la surface du nerf périphérique. Les messagers intracellulaires relâchés induisent une diminution du seuil d'activation des récepteurs multimodaux, ainsi qu'une augmentation de leur population, avec pour conséquence une sensibilisation périphérique

Au niveau central, une exposition prolongée ou intense à un signal douloureux provoque une libération accrue des neuropeptides (substance P, PGCR) et de glutamate. En plus de recruter le récepteur de la N-méthyl-D-aspartate (NMDA), la régulation de plusieurs gènes (NK1, COX-2, TrkB) est exacerbée et va également augmenter le niveau d'expression des protéines déjà présentes à la surface membranaire.^{32,33}

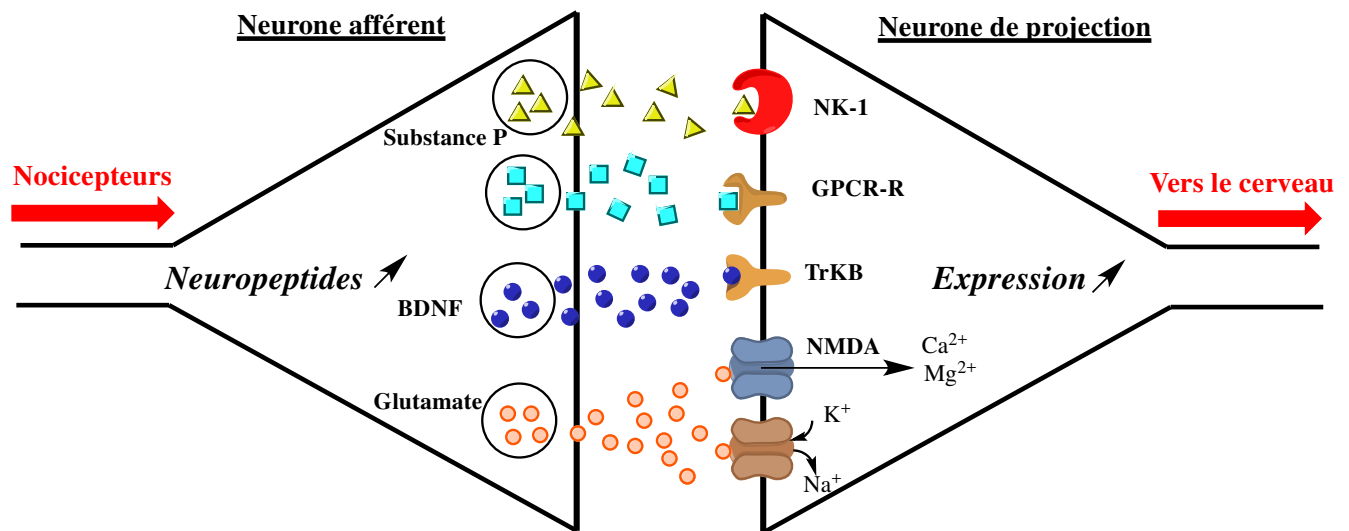


Figure 6. La sensibilisation périphérique engendre une augmentation de neuropeptides relâchés à l'interneurone. La concentration élevée de Ca^{2+} due à l'activation du récepteur NMDA, outre une augmentation de la dépolarisation, provoque une altération de l'expression des récepteurs à la surface du neurone afférent et une augmentation du signal douloureux.

Ainsi, l'ensemble des mécanismes décrits permettent d'expliquer en partie les origines de la douleur neuropathique. Cependant, la présence de plusieurs acteurs à différents niveaux du système nerveux central (SNC), ainsi que l'existence de mécanismes de sauvegarde, rendent le traitement de telles douleurs problématique.³⁴

I.1.3. Traitements de la douleur en clinique

Comme mentionné en début d'introduction, le traitement de la douleur est une des plus grandes préoccupations de l'humain. Lorsqu'il s'agit de décider du traitement, il convient d'évaluer avant tout l'intensité de la douleur. En effet, les différents médicaments à la disposition du praticien sont classés en fonction du type de douleur : modérée, forte ou très intense (**Tableau 2**).³⁵

Tableau 2. Traitements antalgiques en fonction du niveau de douleur

<u>Palier 1 : 0-3/10</u>	<u>Palier 2 : 4-6/10</u>	<u>Palier 3 : 7-10/10</u>
Douleur légère	Douleur modérée	Douleur sévère
Anti-Inflammatoires Non Stéroïdiens (AINS)	Opioides modérés	Opioides forts
Paracétamol	Narcotiques	Morphine
Aspirine	Tramadol	Fentanyl
	Codéine	

Pour la douleur légère, la pharmacopée repose essentiellement sur les composés Anti-Inflammatoires Non Stéroïdiens (AINS) (**Figure 7**). Leur caractère non narcotique présente l'avantage de ne pas créer de dépendance, de troubles de la conscience ou de dépression respiratoire. C'est la classe de molécules antalgiques la plus utilisée dans le monde, et ils sont pour la plupart disponibles en vente libre.³⁶ Ils sont indiqués pour le soulagement de la douleur articulaire de type traumatique (entorse, fracture) ou chronique (arthrose), douleur post opératoire, maux de têtes.^{37,38,39} En dehors d'une prise excessive ou chronique, ils présentent peu d'effets secondaires. En conséquence, la fenêtre thérapeutique (Différence entre la dose menant à des effets secondaires et la dose efficace) de ces composés est très favorable.^{36,38} Le mode d'action de cette classe de molécules repose sur l'inhibition des isoformes d'enzymes de type cyclooxygénases (COX1 et COX2) impliquées dans la production de prostaglandines (responsables de la sensibilisation périphérique) à plusieurs niveaux dans l'organisme.^{39,40}

Historiquement, l'écorce de saule était consommée afin de traiter la douleur et la fièvre. L'isolement de son principe actif la salicyline au début du XIXe siècle,⁴¹ puis la découverte de son dérivé l'acide acétylsalicylique (Aspirine) par Bayer en 1899, ont propulsé cette famille de composés, et en font aujourd'hui le médicament le plus consommé dans le monde.³⁶ Disponible en vente libre, il est utilisé principalement pour le traitement de la douleur,⁴² de la fièvre,⁴³ ainsi que la prévention de thrombose à petite dose par son action antiagrégant plaquettaire.³⁹ À la différence des autres AINS, l'aspirine inhibe de façon irréversible par acétylation les enzymes COX et son effet peut persister jusqu'à 15 jours.⁴⁴ Son usage porte tout de même à caution. En effet, son usage abusif peut entraîner des troubles gastriques sévères (ulcères), ou des allergies.⁴⁵ Elle est bien entendu, contre-indiquée pour les personnes hémophiles (hémorragie) ainsi que chez l'enfant de moins de 16 ans, pour qui un risque d'encéphalopathie (syndrome de Reye) est plus élevé suite à une maladie virale (grippe, varicelle).⁴⁶

On lui préfère aujourd'hui l'acétaminophène (ou paracétamol) dû à son action plus ciblée, surtout pour la dernière classe de patients mentionnée.⁴⁷ Contrairement à l'aspirine ou aux autres AINS, le paracétamol ne possède pas d'action anti-inflammatoire et semble passer par un mode d'action différent, encore très mal compris à l'heure actuelle.^{48,49,50,51} Il présente beaucoup moins d'effets secondaires (notamment au niveau gastrique) et d'interactions médicamenteuses (il peut d'ailleurs être utilisé en combinaison d'autres molécules analgésiques).⁵² Toutefois, un usage excessif aigu ou à long terme peut engendrer de graves déficiences hépatiques, par accumulation d'un de ses métabolites hautement toxiques dans le foie (N-acétyl-*p*-benzoquinone).⁵³ C'est d'ailleurs la raison pour laquelle son usage est déconseillé chez les personnes souffrant de maladies hépatiques.^{54,55,56}

Un autre AINS couramment utilisé est l'ibuprofène (Advil, Nurofen), présentant le même profil thérapeutique que l'aspirine, mais avec une propension aux effets nocifs moindres comparé à cette dernière.⁵⁷ À l'instar des autres AINS, l'ibuprofène est susceptible de créer des maux d'estomac, des éruptions cutanées et parfois une photosensibilisation.^{58,59}

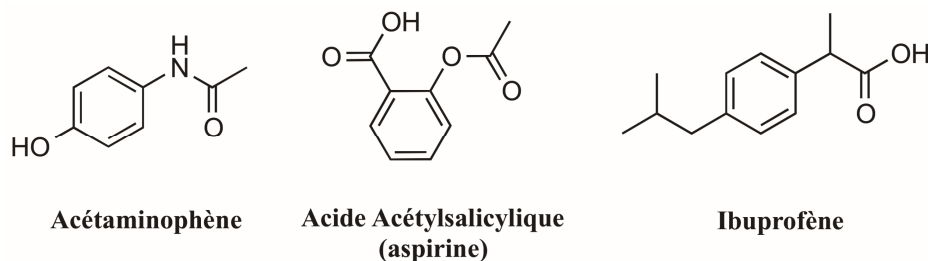


Figure 7. Structure chimique de plusieurs Anti-inflammatoires Non-Stéroïdiens (AINS) utilisés en clinique

La plupart des AINS utilisés en clinique inhibent indifféremment COX-1 et COX-2. Cependant, les effets thérapeutiques sont associés en grande partie à l'inhibition de COX-2, tandis que celle de COX-1 serait responsable des effets délétères.³⁹ Le développement de molécules sélectives à COX-2 apparut prometteur et a mené à la découverte du rofécoxib (Vioxx) et du célécoxib (Celebrex), en 1999.⁶⁰ Malheureusement, il est vite apparu que ces composés COX-2 sélectifs engendraient un plus haut risque de maladies cardiovasculaires,⁶¹ ce qui a provoqué le retrait du marché du rofécoxib en 2004 et à une limitation de l'usage des autres analogues sélectifs aux patients présentant un haut risque de troubles gastriques ou hépatiques.^{39,62}

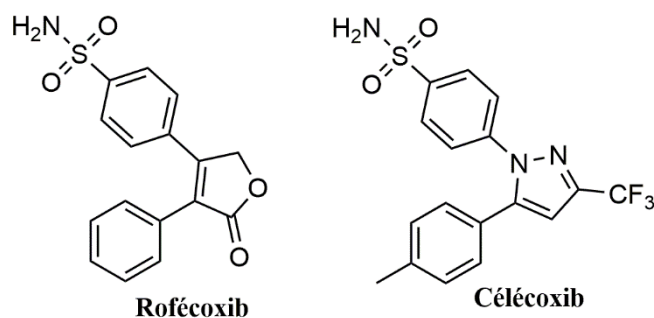


Figure 8. Structure chimiques d'agonistes
sélectifs de COX-2.

Dans le cas de douleurs plus fortes, les AINS sont bien souvent inefficaces, il faut alors se tourner vers les opioïdes et autres dérivés morphiniques (**Figure 9**). Bien que très efficaces, ils ont l'inconvénient de créer une forte tolérance et dépendance physique qui se développent rapidement. Le sevrage est d'autant plus compliqué qu'il s'accompagne de symptômes physiques tels que des nausées, tremblements, fièvre et hypertension. Parmi les effets secondaires, on recense l'euphorie (d'où l'usage récréatif), constipation et détresse respiratoire pouvant conduire jusqu'à la mort.⁶³ De façon similaire aux endopeptides relâchés lors de la voie descendante, ils agissent au niveau central, en inhibant les canaux ioniques responsables du signal de la douleur. Au niveau pré-synaptique, ils inhibent également la formation de neuropeptides (substance P), impliqués dans la transmission du signal entre les neurones.²⁴ Leur large distribution à travers l'organisme est entre autre responsable des nombreux effets secondaires associés à ceux-ci.

De l'antiquité jusqu'au XIX siècle, la douleur de forte intensité était traitée par des extraits de jus de pavot.⁶⁴ La découverte de son principe actif la morphine en 1804, a rapidement propagé son usage contre la douleur par voie intraveineuse. Outre son activité analgésique, elle était également utilisée pour lutter contre plusieurs troubles psychiatriques (alcoolisme, hystérie, trouble bipolaire) au début du XX siècle. Cet usage a toutefois été rapidement abandonné, au vu de son haut profil narcotique. Elle est encore largement utilisée pour les douleurs chroniques ou dans le cadre des soins de fin de vie (cancer par exemple), où elle est administrée par une pompe permettant l'auto administration du patient.⁶⁵ Cette voie d'administration permet d'améliorer le confort de l'individu, tout en contrôlant le dosage et éviter les surdoses.

La codéine, découverte peu de temps après la morphine en 1832, est un agoniste partiel des récepteurs opioïdes (1/10 de la puissance de la morphine). Elle ne diverge de la structure de la morphine que par un méthoxy en position 3. Cette modification a pour effet de diminuer grandement son potentiel analgésique, mais aussi son action centrale et les effets néfastes normalement reliés à la morphine.²⁴ De plus, elle bloque le cytochrome CYP2D6 responsable de sa métabolisation en morphine, et limite ainsi les effets de tolérance sur un traitement à long terme. Administrée par voie orale, elle est utilisée pour les douleurs modérées ou sévères de type arthritique seule ou en combinaison avec des AINS (acétaminophène ou aspirine). Utilisée également contre la toux sèche, on lui préfère aujourd'hui la dextrométhorphan, dépourvue d'action sur les récepteurs opioïdiques, malgré sa structure similaire à celle de la morphine.⁶⁶

Un autre alcaloïde utilisé est la diacétylmorphine (héroïne). Similaire à la morphine d'un point de vue analgésique, la présence des deux groupements acétyles supplémentaires, engendre une augmentation de la lipophilicité et donc une absorption dans le cerveau (où elle est convertie en ses métabolites actifs), beaucoup plus rapide.⁶⁷ Il en résulte un aspect narcotique bien plus fort. Bien qu'utilisée en clinique dans le cadre de substitution à d'autres opioïdes, elle est principalement utilisée illégalement en usage récréatif.⁶⁸ Étant rapidement métabolisée en morphine lors du premier passage hépatique par voie orale, l'héroïne est administrée principalement par voie intraveineuse afin d'obtenir son plein potentiel.⁶⁹

L'élucidation de la structure chimique de la morphine en 1923, a permis l'élaboration de nouveaux dérivés morphiniques possédant le même squelette (Oxycodone) et d'étendre la gamme de molécules à la disposition des praticiens. Cela a eu aussi pour résultat la simplification de son squelette (Fentanyl, Tramadol). Très peu administrée en Europe, l'oxycodone est régulièrement prescrit chez l'adulte en Amérique du nord, pour le traitement de douleur post-opératoire.⁷⁰ Bien que tout aussi narcotique, elle produit moins de détresse respiratoire que la morphine. Concernant le fentanyl, il possède une puissance 100 plus élevée que la morphine mais a un temps d'action plus court.⁷¹ Outre un usage thérapeutique chez l'humain, il est aussi utilisé chez les animaux au regard de son fort pouvoir analgésique. Cette puissance décuplée est responsable de la récente aggravation de la crise des opioïdes en Amérique du Nord, associée à de nombreuses morts dans un très court laps de temps.^{72,73,74} En effet lors d'usage récréatif, l'héroïne est parfois remplacée partiellement ou totalement par du fentanyl à l'insu de l'utilisateur, amenant à une mort rapide par overdose. Pour ce qui est du Tramadol, il possède une puissance légèrement supérieure à la codéine et appartient aux molécules de pallier 2 tout comme cette dernière. Il n'est en général employé

qu'en dernier recours après l'échec des AINS. Il entraîne une légère dépendance, ce qui rend sa prescription plus sensible, comparé aux autres antalgiques de niveau 2.⁶²

Les mises sur le marché de la Naloxone et de la Naltrexone en 1971 et 1984, ont permis respectivement une meilleure prise en charge des abus aux opioïdes et un meilleur accompagnement lors du sevrage.²⁴ La présence d'un groupement plus encombrant sur l'azote, leurs confèrent une activité antagoniste aux récepteurs opioïdes et permet ainsi d'annuler les effets de ces derniers. La Naloxone est présentement utilisée comme antidote en cas de surdose,⁷⁵ et est parfois co-administrée avec d'autres opioïdes afin de prévenir la dépendance.⁷⁶ La Naltrexone est quant à elle plutôt employée pour accompagner les patients lors de sevrage aux opioïdes ou à l'alcool.^{77,78} Elle possède une durée d'action bien plus longue que la Naloxone (10 h environ). Elles présentent toutes deux très peu d'effets secondaires et sont inscrites sur la liste des médicaments essentiels de l'organisation mondiale de la santé (OMS).

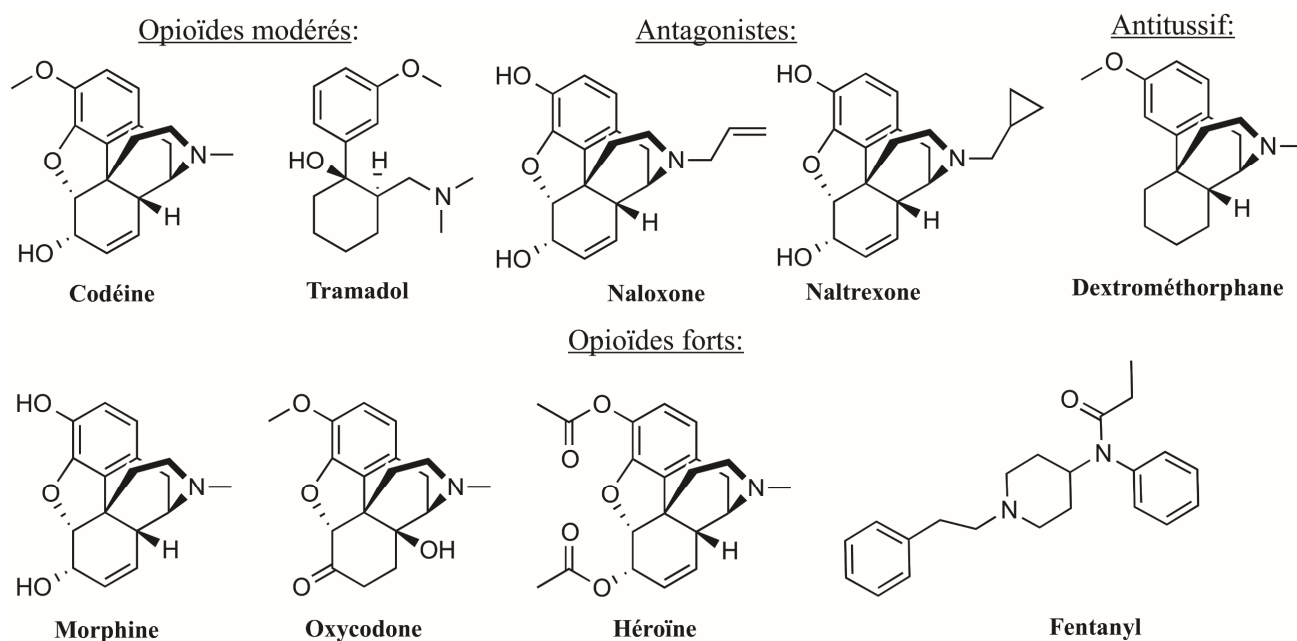


Figure 9. Structure chimique de plusieurs opiacés utilisés en clinique.

Ainsi, le traitement de la douleur par les opioïdes est très délicat. Leurs bénéfices thérapeutiques doivent être balancés avec leurs nombreux effets néfastes, et le jugement du médecin est primordial. Une des solutions à cette problématique, consiste à effectuer une rotation de différents opioïdes afin de diminuer

l'accoutumance au traitement et donc le recours à l'utilisation de doses plus élevées.⁷⁹ Cependant la marge de manœuvre reste très mince.

Dans le cas de douleurs chroniques de type neuropathique, les opiacés donnent souvent des résultats décevants. Il est alors fréquent d'avoir recours à des antidépresseurs tricycliques (amitriptyline), des anticonvulsifs (carbamazépine, gabapentine) ou des agents anesthésiants (kétamine) (**Figure 10**).⁸⁰ Les antidépresseurs agissent en empêchant l'assimilation de la noradrénaline, tandis que les anticonvulsifs bloquent l'activation des canaux tensiodépendants au sodium et calcium surexprimés lors de douleur neuropathique. La kétamine, quant à elle, antagonise les récepteurs NMDA, mais a le désavantage d'être dissociatif (altération de l'état de conscience). Cet effet peut cependant être limité par administration intrathécale.²⁴

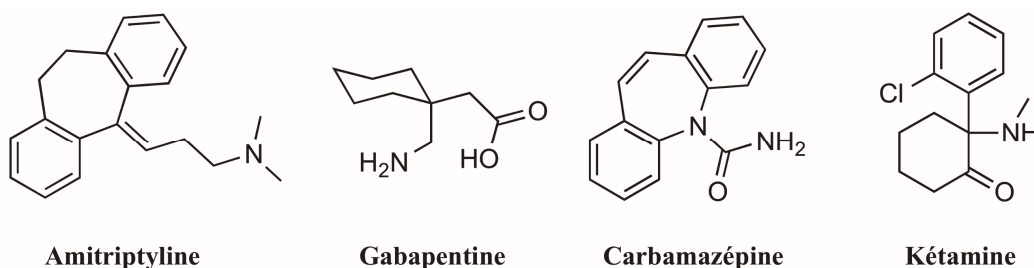


Figure 10. Structure chimiques d'autres classes de composés utilisés pour le traitement de la douleur neuropathique

Ainsi, malgré l'arsenal conséquent de molécules à la disposition des médecins, il est à l'heure actuelle difficile de soulager plus de 50 % de la douleur chez plus de la moitié des patients, rendant nécessaire la mise au point de traitements efficaces dépourvus d'effets délétères.

I.1.4 État de la recherche fondamentale dans le traitement de la douleur.

Afin de remédier à cette problématique, un effort conséquent a été réalisé au cours des vingt dernières années, pour trouver de nouvelles pistes de traitements plus efficaces.⁸¹ Outre la cible classique des récepteurs opioïdes, les chercheurs se sont intéressés aux autres récepteurs impliqués dans le processus de la douleur (**Figure 11**): Les récepteurs GABAergiques, l'inhibition de la substance P, les récepteurs à potentiels transitoires (TRPV1),⁸² les récepteurs de la tyrosine kinase (TrK),^{83,84} les canaux tensiodépendants (Ca^{2+} , K^+ , Na^+),^{85,86,87} les récepteurs ionotropes (NMDA),⁸⁸ les récepteurs métabotropiques (mGlu1).⁸⁹ Leurs rôles ainsi que leurs modes d'actions respectifs ont été décrits en détail précédemment (paragraphe I.1.2.). En dépit de résultats précliniques prometteurs, peu de molécules ont réussi à passer les différentes phases d'études cliniques.²⁴ De grands espoirs avaient été portés sur les récepteurs TRPV1, qui se sont avérés produire de l'hyperthermie, causée par la désensibilisation de ces derniers par l'influx cationique prolongé.²⁴ Des études sont encore en cours pour les autres catégories de cette famille de récepteurs.⁹⁰ Les agonistes des canaux tensiodépendants quant à eux ont démontré une efficacité limitée.²⁴ Ils sont cependant encore à l'étude,⁹¹ en particulier pour les composés sélectifs à $\text{Na}_v1.7$, sous-catégorie surexprimée dans les pathologies chroniques douloureuses.^{92,93} Hormis la kétamine, les autres antagonistes du récepteur NMDA développés n'ont pas démontré d'analgésie chez l'humain, malgré des données encourageantes dans les modèles animaux.^{24,94}

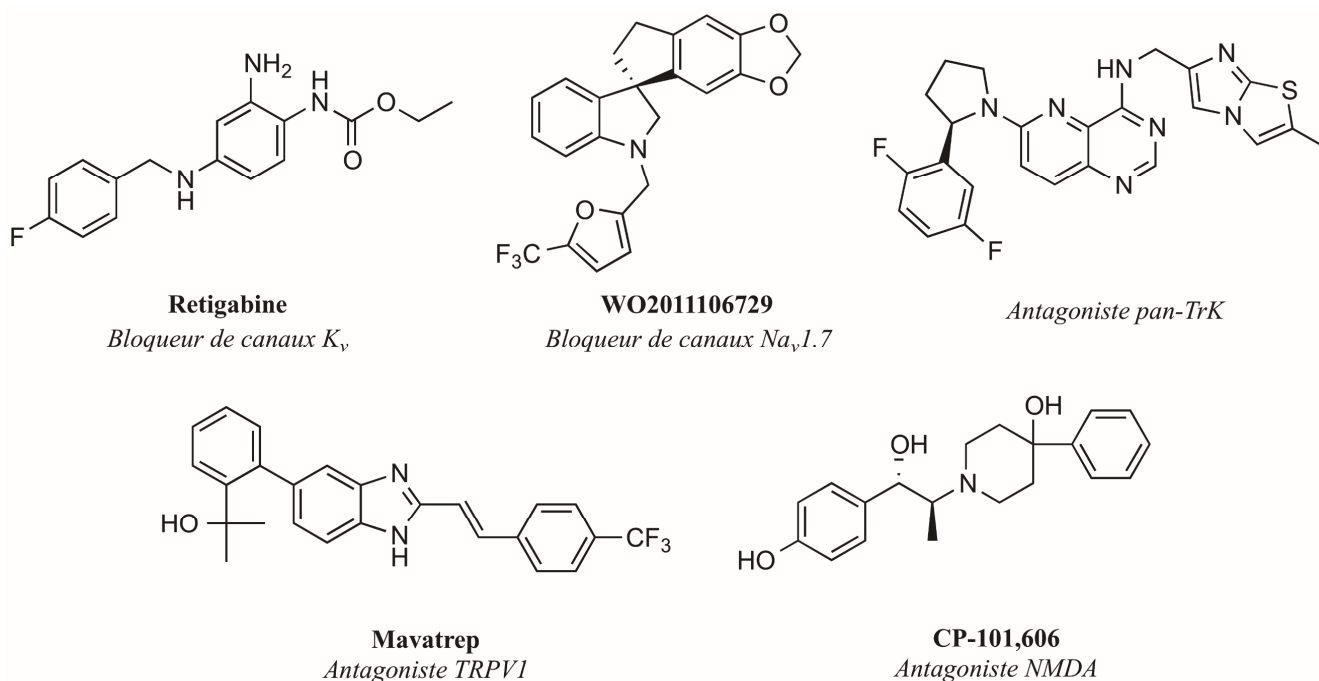


Figure 11. Exemples de molécules pour les cibles alternatives de la douleur.

Récemment, deux pistes de recherche ont émergé avec un fort potentiel thérapeutique (**Figure 12**). La première concerne le développement d'antagonistes du récepteur Sigma 1 ($\sigma 1R$).⁹⁵ Ce récepteur chaperon situé dans le réticulum endoplasmique et la membrane plasmique est activé en condition de stress et interagit avec plusieurs neurotransmetteurs pour moduler leurs actions. Son rôle lors de la sensibilisation centrale a été démontré.⁹⁶ Une série de composés a été mise au point au cours de l'année 2017 et démontre une forte efficacité thérapeutique, ainsi qu'une très bonne spécificité pour ce récepteur.⁹⁷ Leur combinaison avec les traitements aux opioïdes semble également potentialiser leur action sans en augmenter les effets secondaires.⁹⁸

Une deuxième piste prometteuse est celle des cannabinoïdes.⁹⁹ Cette famille de molécules extraites du cannabis, en se liant sur ces deux récepteurs CB₁ et CB₂ semble inhiber la fixation de la glycine impliquée dans la modulation de la douleur. L'inhibition de ces récepteurs pourrait donc avoir une activité analgésique. Cette approche est toutefois limitée par leur effet psychotrope, induit en grande partie par CB₁ densément exprimé dans le cerveau.¹⁰⁰ Au contraire, CB₂ exprimé surtout au niveau périphérique et légèrement au niveau central (dans les cas de douleur pathologique) est dénué de cet effet indésirable. Ainsi, le développement d'antagonistes CB₂ sélectifs pourrait avoir un grand intérêt pour le traitement de douleur chronique.¹⁰¹ Le Canada a d'ailleurs été le premier pays à approuver l'usage du Sativex (cannabidiol/dronabinol, équivalent synthétique du THC) pour le traitement de la douleur neuropathique chez les individus atteints de sclérose en plaques.¹⁰² De la même façon que pour les récepteurs sigma, ces composés démontrent une synergie avec les opioïdes.¹⁰⁰ La recherche dans ce domaine est cependant encore très limitée par les législations strictes dans de nombreux pays ainsi qu'aux mœurs.¹⁰³

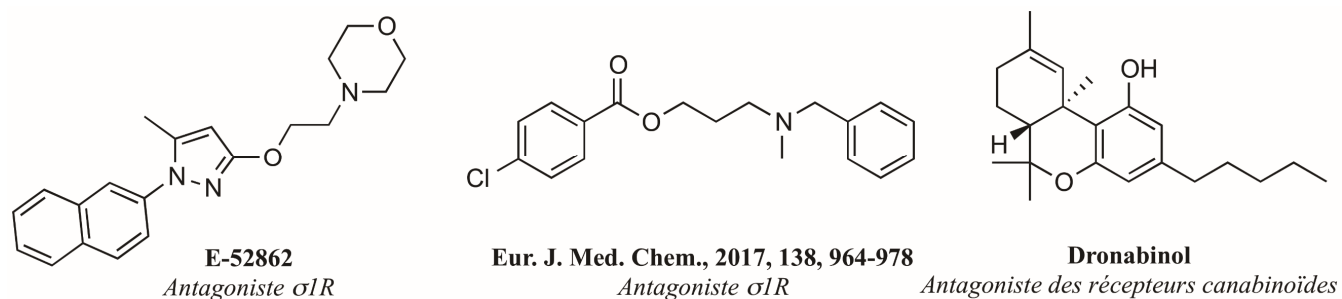


Figure 12. Structure chimiques de molécules ciblant les récepteurs sigma 1 ($\sigma 1R$) et d'antagoniste des récepteurs cannabinoïdes (CB₂).

Ainsi, malgré toutes ces pistes de recherches innovantes, les récepteurs opioïdes restent encore à ce jour la cible de référence pour le traitement de la douleur. Nous allons étudier plus en profondeur la pharmacologie de ceux-ci dans le prochain paragraphe.

I.2 Les récepteurs opioïdes

Afin de mieux comprendre les mécanismes de la douleur, de nombreux efforts de recherche ont été effectués à partir de 1950.²⁴ La découverte de molécules ayant une action antagoniste (Naloxone) sur les récepteurs opioïdes et l'essor des techniques de radiomarquage, ont rapidement amené à la découverte des récepteurs opioïdes au début des années 1970.^{104,105} Leurs ligands endogènes appelés endorphines, seront découverts quelques années plus tard (**Figures 13, 14 et 15**).^{106,107} Ils possèdent tous une tyrosine en position N-terminale, similaire au motif tryptamine présent dans la structure de la morphine. Ce sont des neurotransmetteurs appartenant à la grande famille des Récepteurs Couplés aux Protéines G (RCPG). Leur large distribution dans les différentes composantes du système nerveux central (cerveau, moelle épinière), ainsi que dans le système digestif ou cardiaque explique leur grande efficacité pour le traitement de la douleur, mais aussi leurs nombreux effets secondaires (paragraphe I.2.2) ou leur traitement dérivé (antitussif, antidiarrhéique).¹⁰⁸ Ces récepteurs sont principalement divisés en trois sous types, et ont pour point commun de se lier à la Naloxone.¹⁰⁹ De par leur nature, ils ont une forte tendance à former des homodimères ou hétérodimères entre eux ou avec d'autres récepteurs. Cet aspect explique le succès relatif des traitements hybrides avec les opioïdes lors du traitement de la douleur.

Le récepteur opioïde Mu (abrégé μ ou MOPr), découvert en 1973 par Pert et al, fut nommé ainsi car il fut le premier récepteur à lier la morphine.¹⁰⁵ Il est encodé par le gène *OPRM1*. Il est à l'heure actuelle le récepteur visé par la plupart des molécules opiacées sur le marché.²⁴ En effet, il a été établi que la plupart des propriétés pharmacologiques de la morphine sont attribuables à ce récepteur.²⁴ Son ligand endogène est la β -endorphine (H-Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-Thr-Ser-Glu-Lys-Ser-Gln-Thr-Pro-Leu-Val-Thr-Leu-Phe-Lys-Asn-Ala-Ile-Lys-Asn-Ala-Tyr-Lys-Lys-Gly-Glu-OH). Les endomorphines 1 et 2 (**Figure 13**), tétrapeptides sélectif à MOPr, bien que retrouvés dans plusieurs organes du corps ne peuvent être catégorisés comme ligand endogènes.¹¹⁰ En effet leur proprotéine n'ayant toujours pas été formellement identifiée, cette association est impossible à établir.

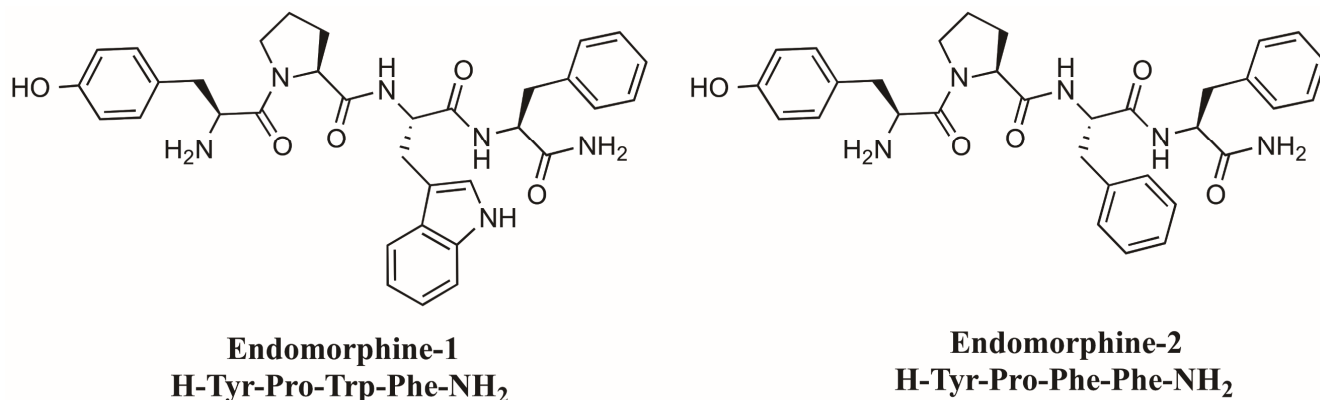


Figure 13. Structure chimique des endomorphines 1 et 2, ligands sélectifs du récepteur MOPr

Le récepteur opioïde Delta (abrégé δ ou DOPr) nommé au vu de son activation du *vas deferens*. Il est encodé par le gène *OPRD*.¹¹¹ Sa population varie en fonction des espèces. Il a pour ligands endogènes les enképhalines (**Figure 14**), pentapeptides dont la structure ne diffère que sur le cinquième résidu (Méthionine ou Leucine).¹⁰⁶

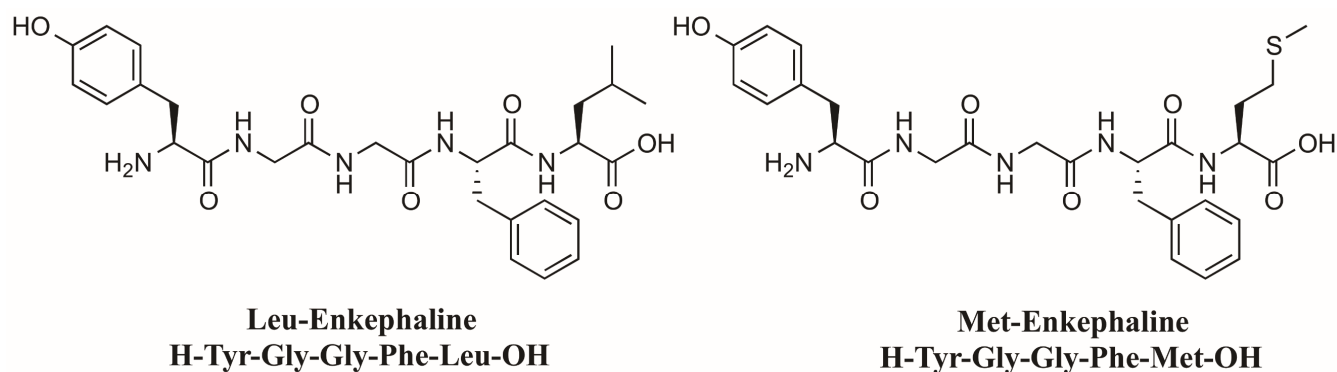


Figure 14. Structure chimique des enképhalines, ligands endogènes du récepteur DOPr.

Le récepteur opioïde Kappa (κ ou KOPr), nommé ainsi car il lie la Kétazocine. Il est encodé par le gène *OPRK1*. La Dynorphine est son ligand naturel (**Figure 15**). Certaines molécules utilisées en cliniques pour le traitement de la douleur sont des agonistes de ce récepteur. Cependant ses effets psychotropes limitent leurs utilisations.¹¹²

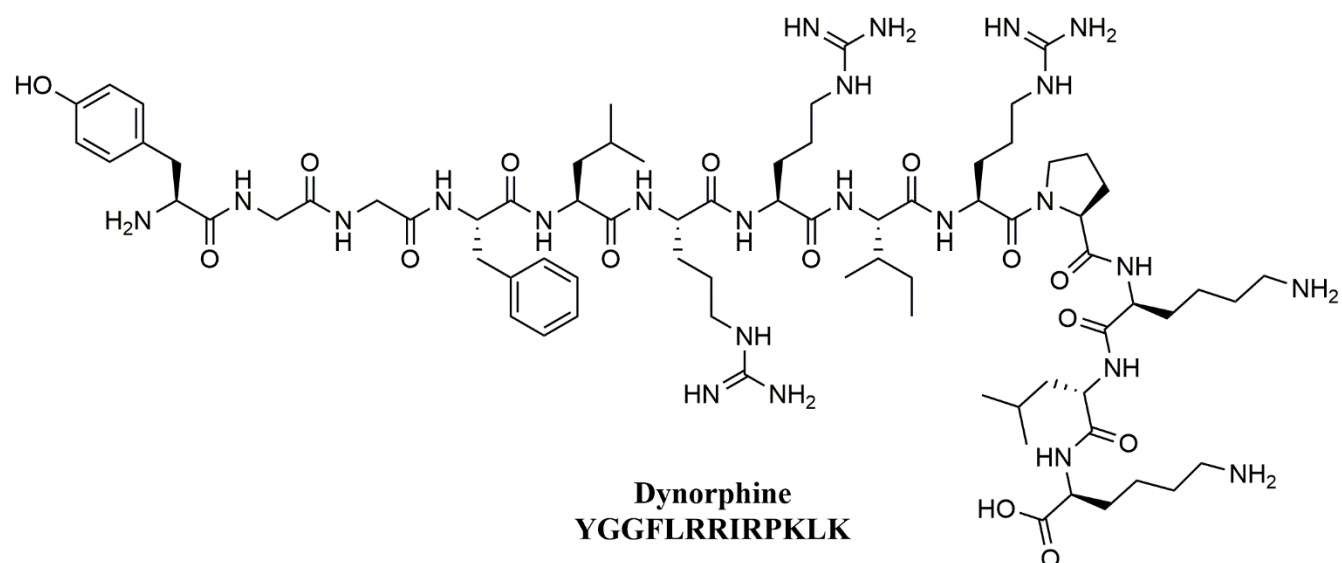


Figure 15. Structure de la Dynorphine, ligand endogène du récepteur KOPr

Plus tard, un quatrième sous type de récepteur a été découvert : le récepteur opioïde Nociceptine (NOR).¹¹³ Codé par le gène *OPRL1*, il lie la Nociceptine (**Figure 16**).¹¹⁴ Malgré sa forte similitude aux trois autres récepteurs (< 60 %), son appartenance à la famille des opioïdes fait encore débat, du fait qu'il ne se lie pas à la Naloxone. De ce fait il ne sera pas discuté plus en détail dans cet ouvrage.

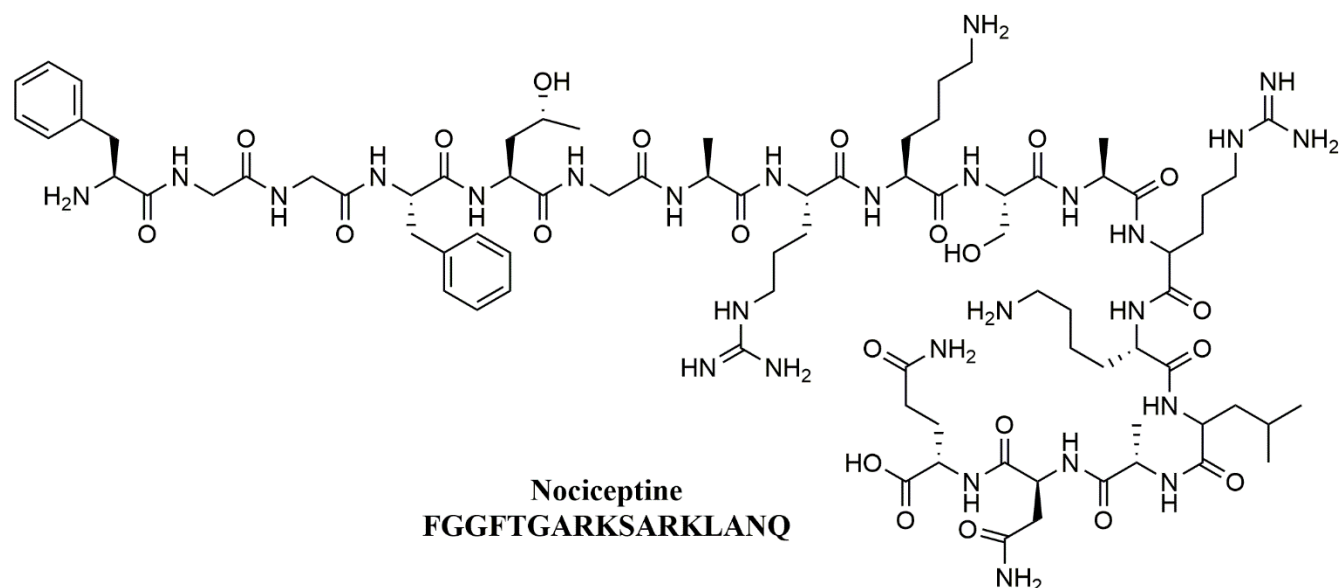


Figure 16. Structure chimique de la Nociceptine, ligand endogène du récepteur NOP

I.2.1 Structure

Les récepteurs opioïdes appartiennent à la grande famille des Récepteurs Couplés aux Protéines G (RCPG). Le nombre de récepteurs appartenant à cette famille est estimé entre 600 et 2000, et est actuellement la cible de 30 à 50 % des médicaments disponibles sur le marché.¹¹⁵ En effet, ce type de récepteurs est responsable de la transduction d'un signal extracellulaire (sous la forme d'un ligand), en un signal intracellulaire (pouvant prendre différentes voies de signalisation et menant à différents ligands). Les travaux de Robert Lefkowitz et Brian Kobilka, récompensés par le prix Nobel de chimie 2012, ainsi que les premières structures cristallographiques parues dans les années 2000, ont joué un rôle crucial dans la compréhension de la structure et des mécanismes d'action de ces récepteurs.^{116,117}

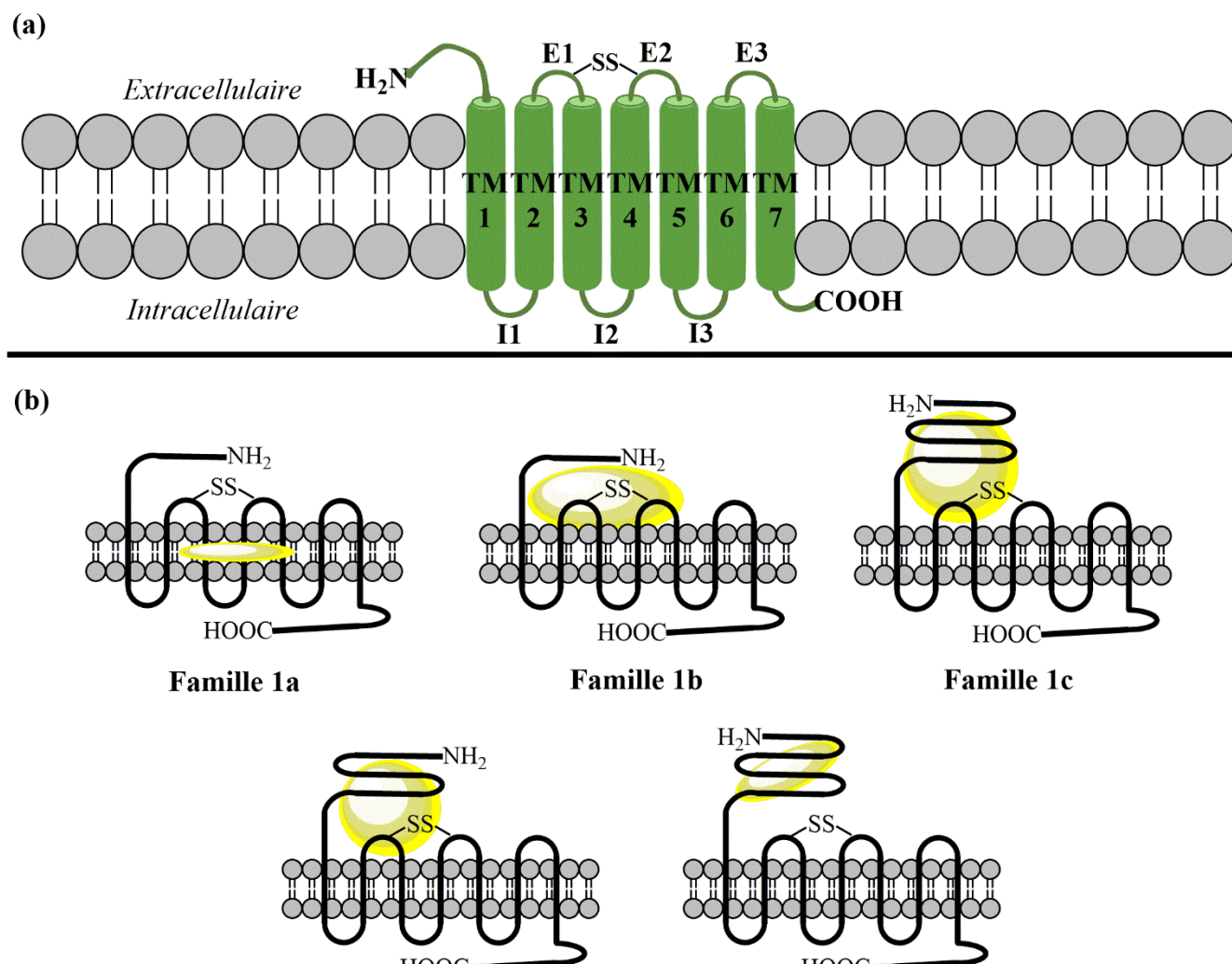


Figure 17. Représentation des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG). (a) Composantes d'un RCPG. (b) Différentes familles de RCPG. Les zones jaunes représentent les sites de liaisons du ligand.

Ils partagent tous en grande partie les mêmes constituants structuraux (**Figure 17a**) : 7 hélices transmembranaires (notées TM1 à TM7), reliées par 3 boucles intracellulaires (I1, I2, I3) et trois boucles extracellulaires (E1, E2, E3).¹¹⁸ L'extrémité N-terminale se situe à l'extérieur de la cellule, tandis que la partie C-terminale se trouve à l'intérieur. Chez la plupart d'entre eux, un pont disulfure relie les boucles E1 et E2. Ils sont classés selon 5 familles (1a, 1b, 1c, 2, et 3), en fonction de leur analogie de structure primaire et de leur site d'interactions avec leurs agonistes (**Figure 17b**).^{119,120} La famille 1a, à laquelle appartiennent les récepteurs opioïdes, lie de petites molécules dans son site actif situé entre les hélices au sein de la membrane. Cette thèse traitant uniquement de ligands aux récepteurs opioïdes, les autres familles ne seront pas décrites plus en détail. Il est toutefois intéressant de noter que les récepteurs GABA et glutamates, énoncés brièvement plus tôt, appartiennent à la famille 3, dont les ligands interagissent seulement sur l'extrémité N-terminale.

La liaison d'un agoniste sur le récepteur engendre une légère modification de la disposition des hélices transmembranaires, suffisante pour provoquer les interactions du RCPG avec ses protéines G hétérotrimériques (α , $\beta\gamma$) en position C-terminale. La sous-unité α existe en tant que monomère, alors que β et γ forment un dimère considéré comme indissociable. Ces sous-unités α , β , ou γ , ont une grande diversité et sont les intermédiaires de la transduction du signal. Ces protéines G, selon la similarité structurelle de leur sous-unité α sont classées en plusieurs familles : Gs, Gi, Gq et G12. Gs stimule l'adénylate cyclase responsable de la production d'AMPC (second messenger cellulaire associé à Gs et Gi), tandis que Gi l'inhibe. Gq quant à elle, est impliquée dans la stimulation de la phospholipase C β ,¹¹⁸ qui va hydrolyser le PIP2 en DAG et IP3. Le DAG va alors activer la PKC, alors que l'IP3 va se lier sur son récepteur au niveau du réticulum pour provoquer la relâche calcique (second messenger cellulaire associé à Gq). G12 pour sa part, en se liant avec les protéines RhoGEF, vont stimuler leur activité GEF (*guanine exchange factor*) et contribuer à l'activation des voies de signalisations liées aux RhoGTPases. Ces dernières sont impliquées dans le remodelage du cytosquelette, les jonctions cellulaires et autres processus relatifs au mouvement cellulaire. Tous les processus mentionnés précédemment sont des signalisations protéines-G dépendantes, à l'inverse des signalisations indépendantes à ces protéines G, telle que le recrutement de la β -arrestine (sur laquelle nous reviendrons plus tard).

Lors de l'activation du récepteur, le guanosine diphosphate (GDP) normalement fixé à la sous-unité α , va perdre son affinité avec celui-ci et être remplacé par une molécule de guanosine triphosphate (GTP) présente dans le cytosol (**Figure 18**). Il en résulte la dissociation de α et $\beta\gamma$, qui vont alors se fixer sur des

enzymes (adénylate cyclase) ou des canaux ioniques (Na_v , K_v , ...). De par sa nature, la sous-unité α hydrolyse rapidement le GTP, pour la reconvertir en GDP. Perdant de ce fait son affinité pour l'effecteur, elle se réassocie alors avec $\beta\gamma$ pour reformer le trimère.

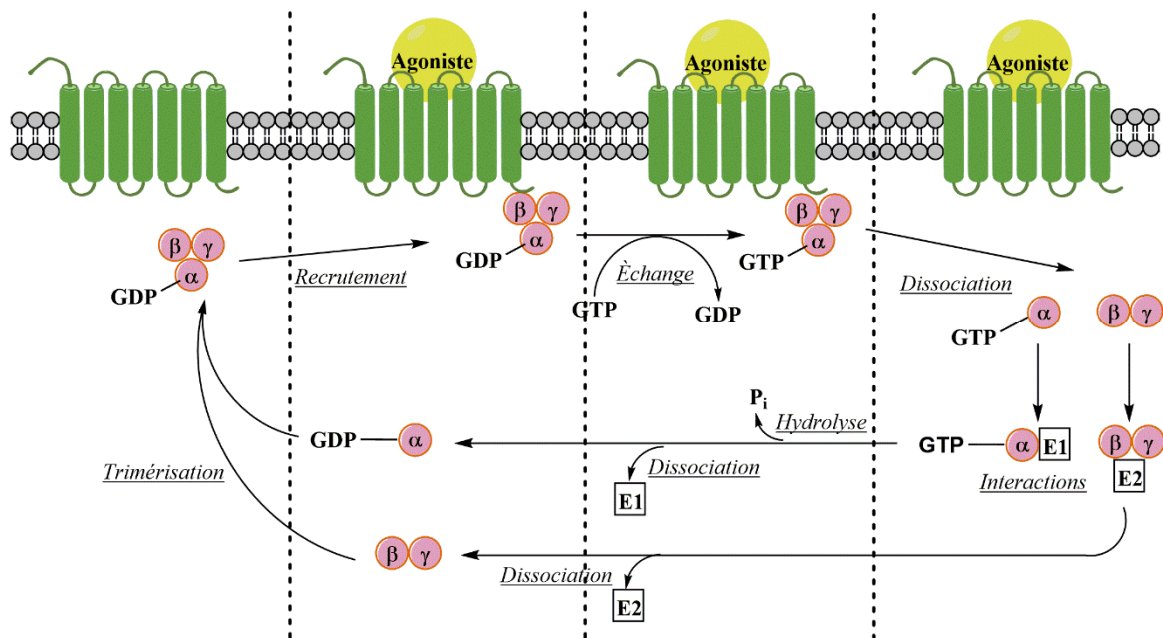


Figure 18. Cycle d'activation des protéines G trimériques (composées de leurs sous-unités α , β , γ)

Longtemps limitée à des modèles adaptés des premier cristaux de RCPG de la même famille disponibles, l'étude des récepteurs opioïdes a été révolutionnée par la divulgation de la structure cristallographique de MOPr (4DKL) en 2012,¹²⁰ suivi de peu par DOPr (4EJ4 et 4N6H)^{121,122} et KOPr (4DJH).¹²³ Ces structures ont toutefois le désavantage d'être les structures inactives liées à leur antagoniste (respectivement β -FNA, Naltrindole et JDTic). En effet l'activation des RCPG étant un processus dynamique très rapide, il est compliqué de pouvoir cristalliser ces protéines dans leur état actif (contrairement à l'état inactif bien plus stable énergétiquement).^{124,125} Il a toutefois été possible en 2015, grâce aux progrès dans les techniques de cristallisation, de cristalliser MOPr lié à l'agoniste BU72 (5C1M).¹²⁶

La structure tertiaire de ces trois récepteurs est somme toute assez similaire du fait de leur haut degré d'homologie dans leur séquences (76 % entre MOPr et DOPr, 73 % entre DOPr et KOPr, 76 % entre MOPr et KOPr).¹¹³ En regardant de plus près (**Figure 19**), on constate que le repliement de la partie intracellulaire des récepteurs est hautement conservé, alors que la plupart des différences observées sont

dans la partie « haute » du récepteur à l'extérieur de la membrane, et ce malgré des différences de résidus comme dans le cas de la boucle E2.

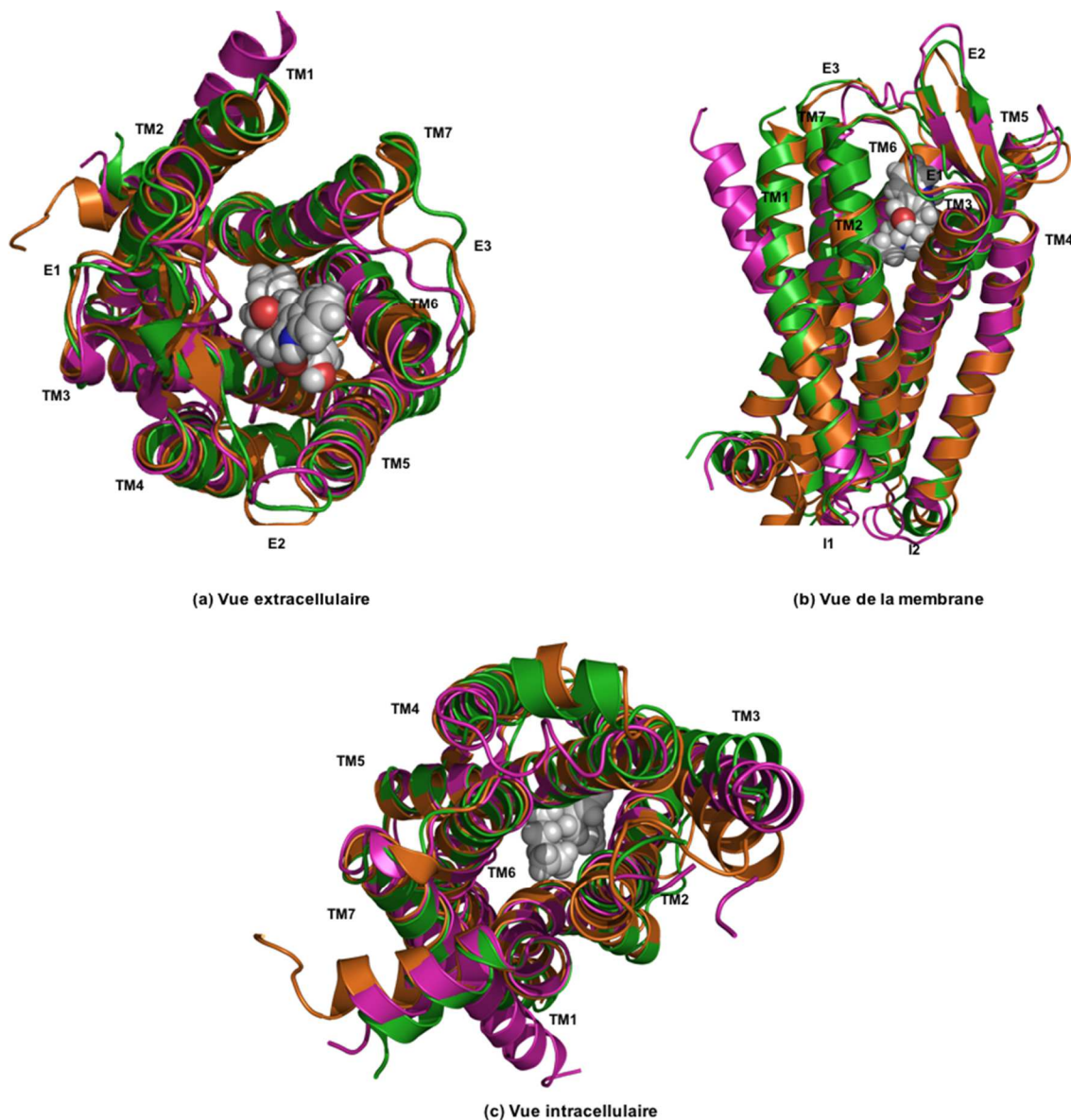


Figure 19. Superposition des structures rayons X des récepteurs opioïdes MOPr (4DKL, en vert), DOPr (4N6H, en orange) et KOPr (4DJH, en violet). Par souci de clarté, seul le NaTrindole est représenté (en CPK) dans la cavité.

Cela nous amène à discuter d'un paradigme primordial pour la suite du projet : le concept « message-adresse » (**Figure 20a**).¹²⁷ Le site actif de ces récepteurs peut être schématisée comme un calice dont la

partie basse hautement conservée d'un sous-type à l'autre, produirait l'activation biologique (message),¹²⁸ tandis que la partie haute, où se situe la plupart des différences serait responsable de la préférence d'un ligand pour MOPr, DOPr ou KOPr (adresse).¹²⁹ Cette réponse biologique consécutive à la liaison d'un ligand, s'opère par des réarrangements conformationnels qui se propagent le long du squelette du RCPG, depuis le site de liaison du ligand jusqu'au site de liaison des protéines effectrices que sont les protéines G et les β -arrestines. La plupart des ligands peptidiques (**Figure 20b**) des récepteurs opioïdes possèdent une tyrosine dans leur séquence en position N-terminale, similaire au noyau tyramine (en gras, **Figure 20a et 20b**) des morphinates et interagissent avec les résidus de la partie message de façon analogue. En revanche leur séquence diverge en C-terminal, ce qui explique leur sélectivité pour les différents récepteurs. Les deux glycines en positions 2 et 3, quant à elles agissent comme « espaceur » entre la partie adresse et message, afin de replier les peptides dans leur conformation active.

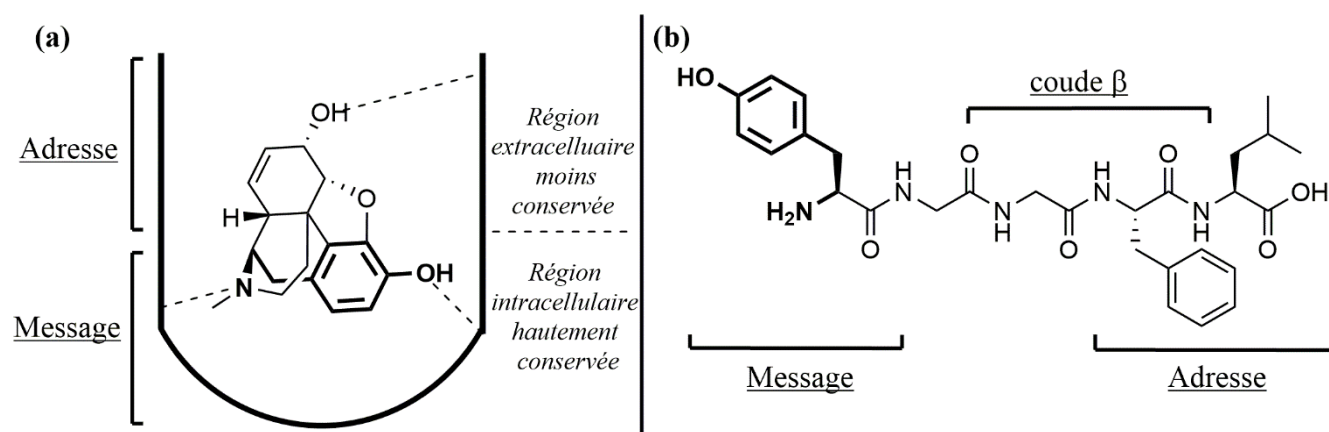


Figure 20. Concept « Message-Adresse ». (a) Schéma dans les récepteurs opioïdes ; (b) Concept appliqué à la Leu-Enképhaline, ligand endogène du récepteur DOPr.

Au niveau de la partie message, le diagramme de liaison entre les ligands et les récepteurs est bien compris. Les ligands interagissent avec le récepteur par le noyau tyramine où l'amine forme une liaison hydrogène avec le carboxylate de l'acide aspartique^{3,32} (notation Ballesteros-Weinstein : deux nombres N1 et N2 sont assignés aux résidus situés dans le domaine transmembranaire, où N1 représente TM et N2 le nombre relatif du résidu par rapport au résidu le plus conservé),¹³⁰ tandis que le noyau phénolique forme un pont salin avec l'histidine^{6,52} via deux molécules d'eau. La mutation de ces résidus par des acides aminés électroniquement neutres a d'ailleurs résulté en une perte totale de l'activité, démontrant leur rôle essentiel.¹³¹ Aussi, on constate que la plupart des antagonistes possèdent tous un groupement encombrant en N-terminal (CH₂-isopropyle ou propargyle), démontrant ainsi que les substituants sur cette

position ne doivent pas être trop gros si l'on souhaite conserver l'activité. Cette observation s'applique aussi aux peptides endogènes seulement si l'ammonium terminal est disubstitué par ces groupements encombrants.¹³² D'autres résidus conservés sont également parfois impliqués dans la partie message du récepteur tel que Met^{3.36}, Tyr^{7.43}, Trp^{6.48}, et Tyr^{3.33}. Un aperçu des interactions essentielles est décrit dans la **Figure 21**. Les séquences étant conservées pour tous les récepteurs, seul la structure de DOPr liée à l'antagoniste Naltrindole est représentée, par souci de clarté.

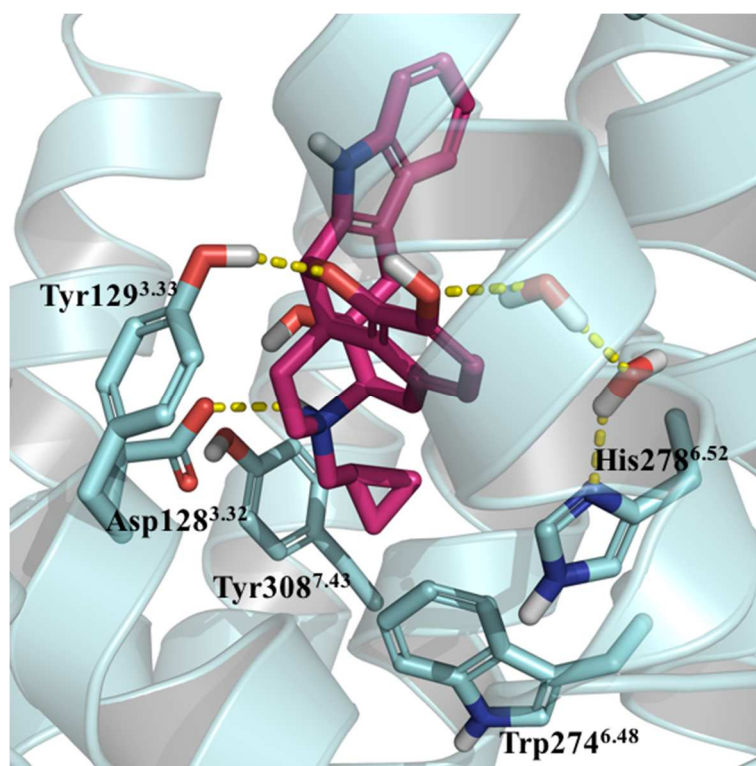


Figure 21. Interactions moléculaires dans la partie message du récepteur DOPr (en bleu) avec l'antagoniste Naltrindole (en rose). Les résidus affichés sont conservés dans les trois récepteurs et noté selon les codes des résidus de DOPr.

Dans la partie supérieure du récepteur, l'identification des interactions responsables de la sélectivité est plus ardue.

Concernant MOPr, la partie adresse de ses ligands est généralement petite et électroniquement neutre (**Figure 22**). Elle peut varier selon qu'elle est un squelette morphinique ou peptidique. La partie supérieure de la morphine explique d'ailleurs son manque de sélectivité pour les différents récepteurs.

Ainsi, la sélectivité pour MOPr repose plus sur la répulsion envers les autres récepteurs que par des interactions intermoléculaires favorables.

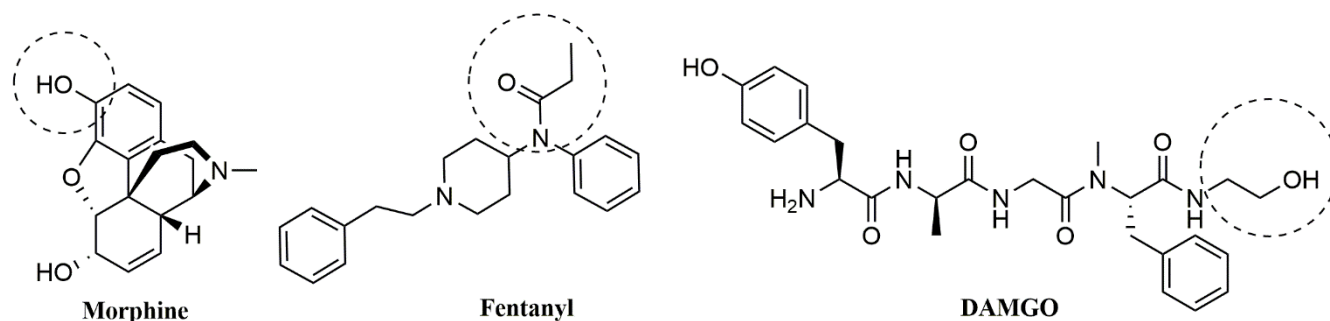


Figure 22. Ligands sélectifs au récepteur MOPr et leur partie adresse.

Pour DOPr, la composante adresse est en général plus commune aux différents ligands et regroupe des groupement aromatiques (indole du Naltrindole), ou/et une fonction anionique (carboxylate en C-terminale des enképhalines, ou carboxylate de Asp/Glu chez les deltorphines) (**Figure 23**). Comme nous allons le voir un peu plus loin, la chaîne latérale du cinquième résidu des enképhalines joue un rôle primordial sur la sélectivité par la formation d'interactions hydrophobes spécifiques à DOPr. En effet, une chaîne trop encombrante va rapidement produire un clash stérique avec les résidus présents dans KOPr et MOPr.

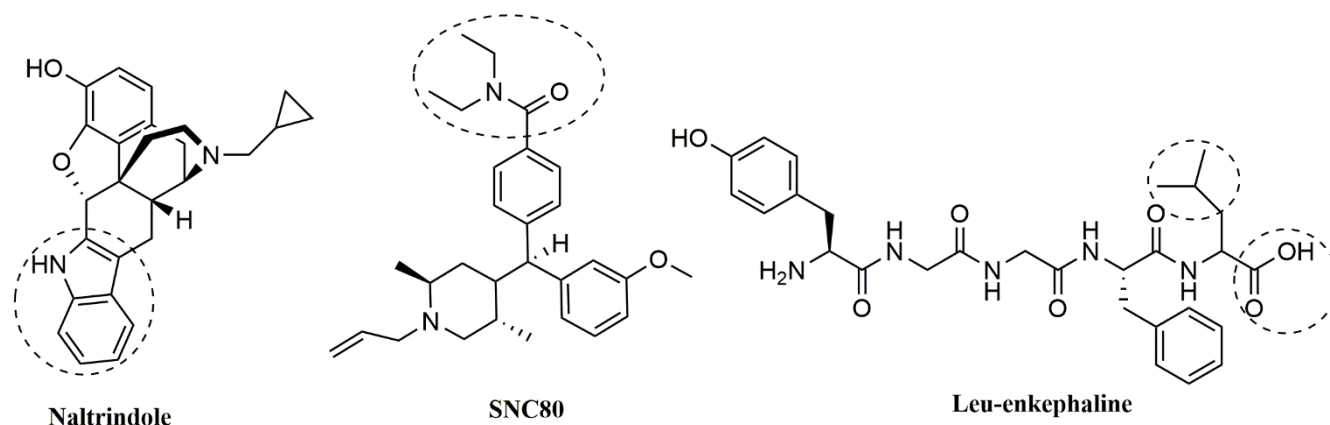


Figure 23. Ligands sélectifs à DOPr et leurs composantes responsables de la sélectivité

KOPr ayant un degré de divergence plus élevé que les deux autres types de récepteur, la sélectivité KOPr/MOPr ou KOPr/DOPr est plus facile à établir que la sélectivité entre MOPr et DOPr. Ils possèdent

en général un site cationique de type ammonium (guanidyl dans les arginines de la dynorphine ou amine tertiaire dans le NorBNI) (**Figure 24**).

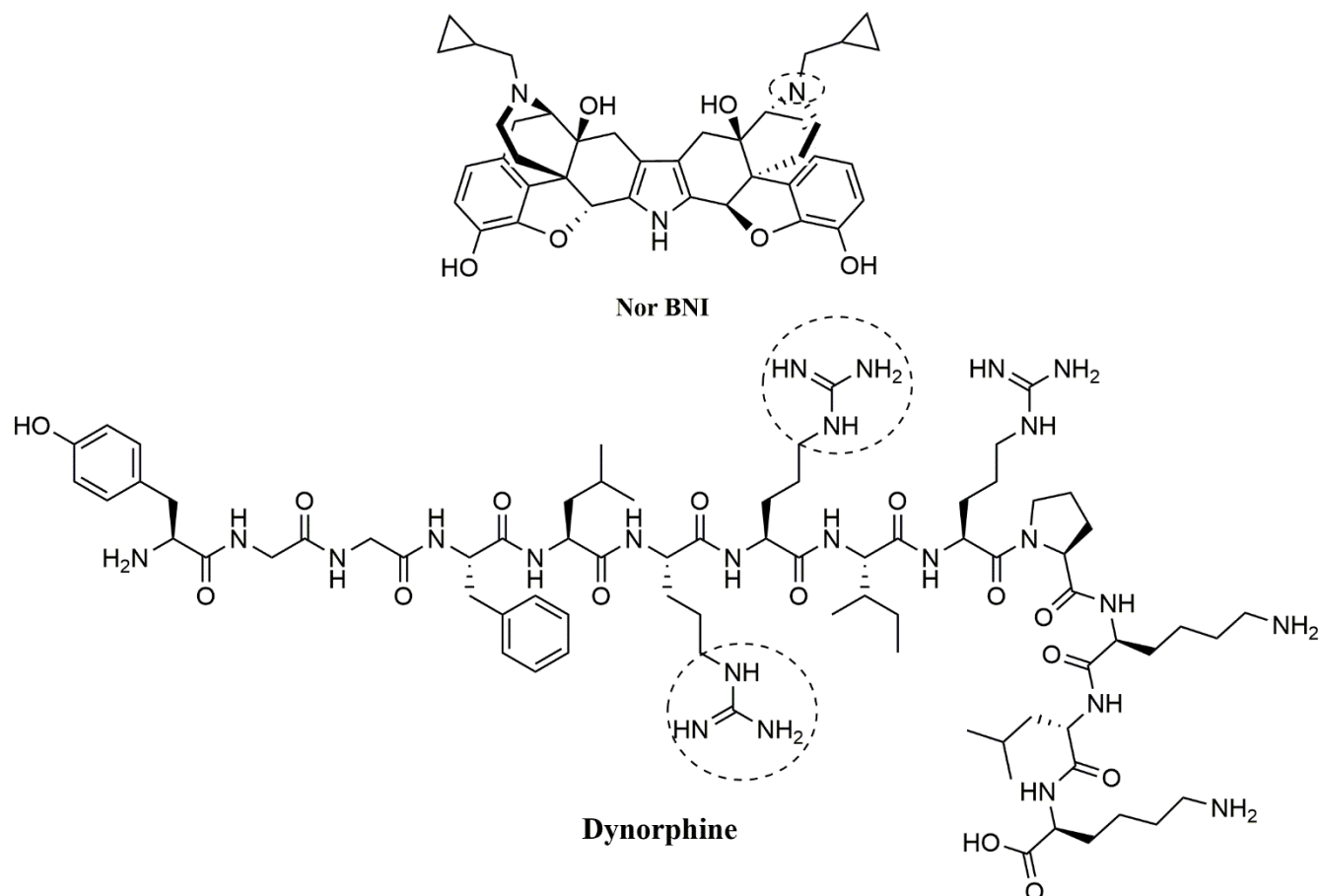


Figure 24. Ligands sélectifs à KOPr et représentation de leurs composantes adresse.

Tous les ligands n'ont pas le même schéma d'interactions responsables de leur sélectivité. Afin de mieux comprendre les interactions impliquées dans la création de la sélectivité, il convient de s'intéresser aux résidus de la protéine éventuellement impliqués dans celle-ci (Tableau 3).¹²¹ Ils sont en général situés dans la partie haute des récepteurs et en particulier dans les boucles E1 et E3.

Tableau 3. Résidus jugés important pour la sélectivité entre les récepteurs opioïdes

MOPr	DOPr	KOPr
Asn129	Lys108	Val118
Asp218	Val197	Glu209
Thr220	Met199	Ser211
Lys305	Trp284	Glu297
Glu312	Arg291	His304
Trp318	Leu300	Tyr312

Si l'on regarde de plus près la structure du Naltrindole dans le récepteur DOPr, on peut constater que la partie indolique de la molécule est dirigée vers la Leucine300 (**Figure 21**). Or cette dernière est remplacée par un tryptophane (MOPr) ou une tyrosine (KOPr), bien plus encombrante (**Figure 25**). Le clash stérique qui en résulte et la rigidité de cette molécule, empêchent l'éventuelle accommodation du ligand, expliquant sa grande sélectivité pour DOPr. Les résidus Trp284 et Arg291 sont également supposés jouer un rôle dans cette sélectivité en formant des ponts salins ou un empilement π entre le carboxylate de certains ligands DOPr (Enképhalines, SNC80) ou un cycle aromatique (Naltrindole) et leurs chaînes latérales.

L'étude de la structure du JD_{Tic} dans KOPr quant à elle, est aussi riche d'information (**Figure 25**). Sa partie adresse s'enfonce plus profondément dans la poche hydrophobe comparée au Naltrindole. Là où la présence de Tyr312 (à la place de Leu300) est néfaste pour le Naltrindole, elle est au contraire bénéfique pour le JD_{Tic} en formant un pont hydrogène entre l'amide du ligand et le noyau phénolique. Aussi, la mutation de Trp284 dans DOPr en Glu297, explique l'efficacité de la présence d'amines protonées dans la Dynorphine ou le Nor-BNI, avec lesquelles il va préférentiellement former une liaison hydrogène.

Finalement, le β -FNA dans le récepteur MOPr, conserve la plupart des interactions du Naltrindole, à l'exception de la lysine233 (à la position de Trp284 dans DOPr), liée de façon covalente à l'antagoniste. Cela démontre les subtiles différences entre MOPr et DOPr. Pour obtenir plus d'éclaircissements sur la sélectivité entre ces deux récepteurs, il faut aller consulter la structure du Dmt-Tic-Phe-Phe-NH₂ dans

DOPr (4RWD).¹³³ Cette molécule étant à la fois agoniste MOPr et antagoniste DOPr, sa cristallisation a été possible et très instructive.

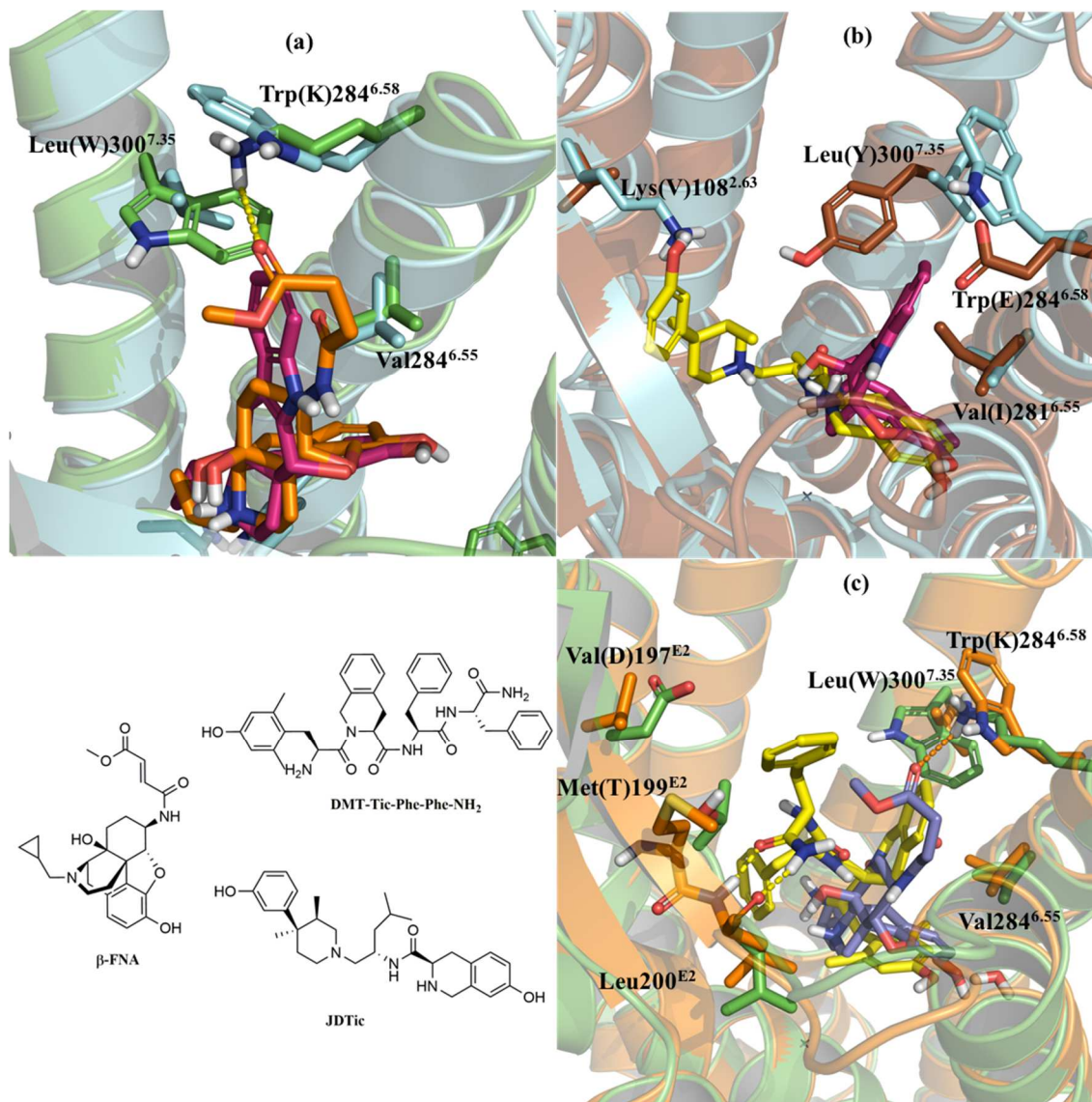


Figure 25. Structure 3D de la partie adresse des récepteurs opioïdes liés à leur antagoniste respectif. (a) Naltrindole (rose) et β-FNA dans DOPr (Bleu) et MOPr (vert). (b) Naltrindole (rose) et JDtic (jaune) dans DOPr (bleu) et KOPr (orange). (c) β-FNA (violet) et Dmt-Tic-Phe-Phe-NH₂ (jaune) dans DOPr (orange) et MOPr (vert). Les résidus sont notés selon la séquence de DOPr et entre parenthèse les mutations pour les autres récepteurs.

Pour ce qui est de son positionnement dans DOPr, il est relativement similaire au Naltrindole, à la différence que la molécule occupe une plus grande surface du récepteur par ses deux phénylalanines au niveau des hélices TM2 et TM6. Celles-ci viennent former des interactions hydrophobes avec les résidus Val197 et Met199, là où ceux-ci sont remplacés par des acides aminés polaires dans MOPr (respectivement Asp218 et Thr220). La gêne stérique entre le Tic et Trp284 de DOP est supposée être en partie responsable de son caractère antagoniste (de façon similaire au Naltrindole). Ce résidu étant remplacé par Lys303 dans MOPr, cela ne pose plus de problème, d'où le caractère « double-face » de cette molécule.

Les modes d'interactions régissant la liaison des ligands agonistes ou antagonistes sur les récepteurs opioïdes expliqués, intéressons-nous maintenant aux changements conformationnels produits lors de l'activation.¹³⁴ Comme il l'a été mentionné un peu plus tôt, l'obtention d'un cristal lié à un de ses agonistes est très difficile, et la plupart de ces formes actives obtenues appartiennent à la Famille 1a. Seule la structure de MOPr lié à BU72 est aujourd'hui disponible pour les récepteurs opioïdes.¹²⁶ Les progrès récents dans les techniques de cristallisation de RCPG devraient cependant délivrer dans un futur proche d'autres cristaux.^{135,136,137,138}

Après activation par un agoniste, la structure du récepteur est sensiblement similaire, à l'exception de l'hélice TM6 qui bouge sa partie intracellulaire, afin de créer une cavité capable de recevoir la sous-unité α de la protéine G.¹³⁹ À cela s'ajoute une légère rotation de TM5, élargissant elle aussi la cavité. La publication récente de structures activées de RCPG, auxquelles sont attachées des protéines G en C-terminale, confirment cette tendance et suggère que ce mécanisme serait partagé pour la plupart des RCPG, même distant structurellement.^{135,140,141}

Plusieurs motifs structuraux notables sont aussi observables lorsque MOPr est activé. Parmi eux, la séquence DRY/ERY situé dans la partie intracellulaire de TM3, supposément nécessaire à la stabilisation de la forme inactive via un pont hydrogène avec Glu^{6.40} est altérée.^{122,142} En contrepartie, il se forme un nouvel arrangement stabilisant cette fois la forme active (**Figure 26a**). Ce verrouillage lie le motif NPxxY de TM7 avec TM5 entre Tyr^{7.53} et Tyr^{5.58} par l'intermédiaire d'une molécule d'eau. Lors de l'activation, Tyr^{5.58} stabilise également Arg^{3.50} du motif DRY/ERY. Cette particularité est également observée dans d'autres RCPG de la même famille.¹³⁴

Tout comme le récepteur β -adrénergique, l'activation de MOPr induit le pivotement des acides aminés Phe^{6.44}, Pro^{5.50}, et Ile^{3.40} situés en dessous du site actif (**Figure 26b**). Le réarrangement de cette triade est responsable du déplacement de TM6 et donc de l'expansion de la cavité intracellulaire, permettant le recrutement des voies intracellulaires.¹⁴³

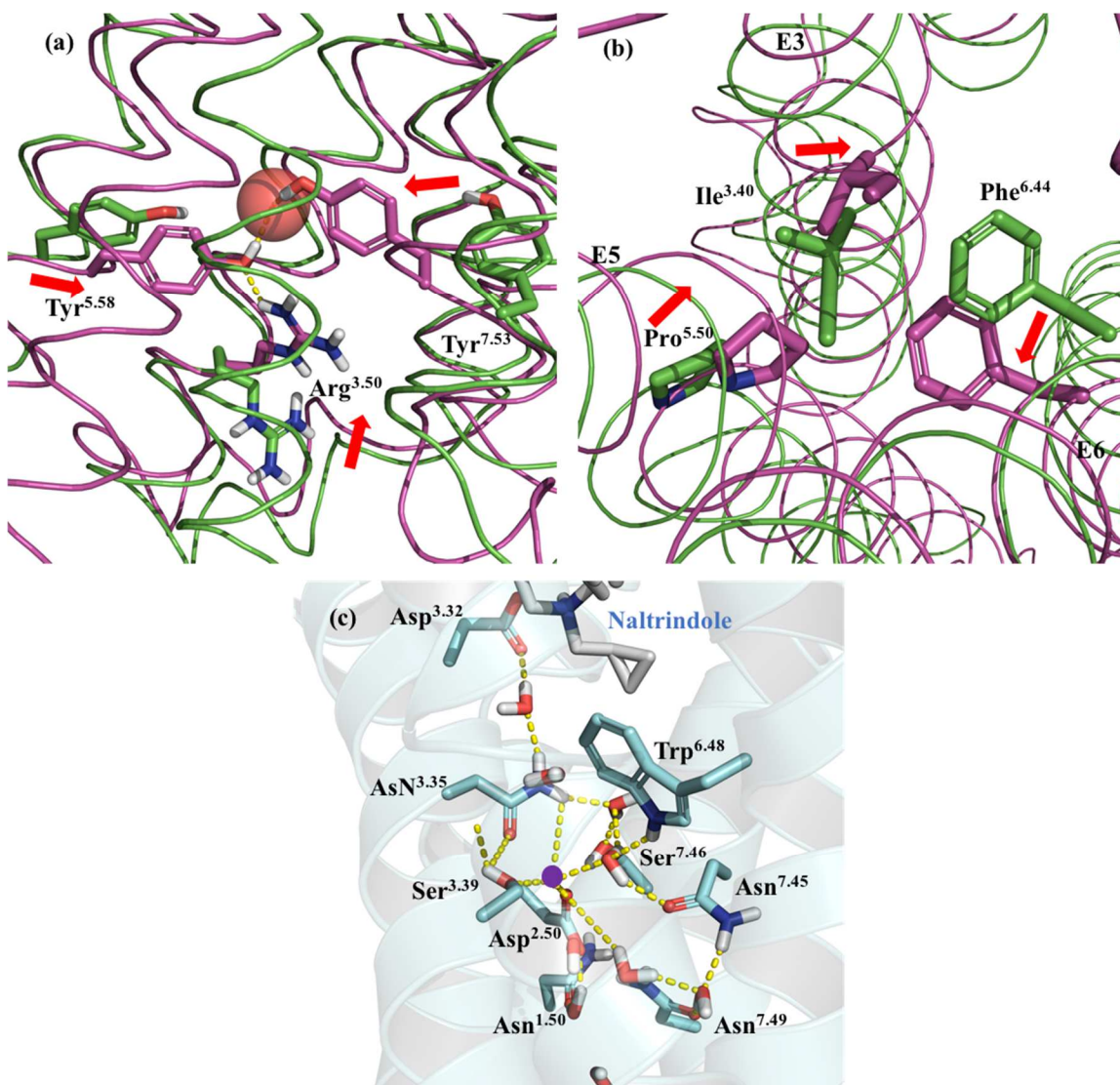


Figure 26. Réarrangements intracellulaires suite à l'activation du récepteur par un agoniste. Les flèches indiquent le sens de déplacement des hélices. (a) Verrouillage de la conformation active (5C1M, violet) par des ponts salins entre Tyr^{5.58}, Tyr^{7.53}, Arg^{3.50} et une molécule d'eau (sphère rouge). (b) Déplacement des hélices 3,5 et 6 par le réarrangement de Ile^{3.40}, Phe^{6.44}, et Pro^{5.50}. (c) Réseau polaire impliqué dans le site orthostérique sodium (sphère violette) du récepteur DOPr inactif (4N6H, bleu), détruit lors de l'activation des récepteurs opioïdes

Situé un peu plus proche du site actif, se trouve un autre site important pour l'activation du récepteur : le site sodium.¹⁴⁴ Bien que mis en évidence depuis longtemps pour son rôle d'inhibiteur des agonistes opioïdes,¹⁴⁵ ce modulateur allostérique (différent du site de liaison du ligand) n'a été découvert pour la première fois qu'en 2014 dans le cristal de DOPr humain (4N6H), grâce à sa plus haute résolution (1.5 Å).¹²² L'ion sodium est coordonné par plusieurs résidus hautement conservés de TM2, TM3 et TM7 à travers un large réseau de molécules d'eau (**Figure 26c**). L'activation du récepteur provoque une réorganisation de cette triade et engendre une déstabilisation du système, provoquant lui aussi l'ouverture de la face intracellulaire.

Par ailleurs, la publication très récente de la structure tridimensionnelle d'une conformation active du récepteur KOPr lié à un agoniste confirme les observations énoncées précédemment pour le récepteur MOPr.¹⁴⁶

Le recrutement des protéines G trimériques, rendu possible grâce aux précédents réarrangements des hélices va alors provoquer une myriade de cascades intracellulaires, dont nous allons détailler les importantes dans le cadre du projet.

I.2.2 Processus intracellulaires et mode d'action sur la douleur

Comme nous l'avons mentionné précédemment, les mécanismes de contrôle de la douleur sont complexes et agissent à plusieurs niveaux : local ou central (moelle épinière), en contrôlant l'intensité d'informations nociceptives envoyées par le système périphérique vers le SNC, ou par la voie descendante. De la même façon, l'activation des récepteurs opioïdes va bloquer la douleur aux mêmes endroits.

Au niveau moléculaire, l'activation du récepteur opioïde va enclencher toute une cascade de réactions biochimiques (**Figure 17**).²⁴ Parmi-elle, le recrutement de la protéine Gi va provoquer une inhibition de l'Adenyl Cyclase et donc une diminution de l'Adénosyl Monophosphate cyclique (cAMP). Cette diminution a pour conséquence d'ouvrir les canaux potassiques, engendrant un potentiel d'action en opposition à ceux engendrés par les médiateurs excitateurs (substance P, glutamate) et donc diminution du signal douloureux. À cette action descendante s'ajoute un deuxième volet d'action au niveau des

récepteurs présynaptiques. En effet, le recrutement de Gi, grâce à ses sous unités α ou $\beta\gamma$, va permettre de diminuer la population de neuromédiateurs à la surface des synapses. Lors du recrutement de G α_i , la diminution de la concentration en cAMP va provoquer une phosphorylation moindre des canaux calciques, engendrant une exocytose due à l'influx de protons Ca^{2+} . Concernant les sous-unités $\beta\gamma$, la même conclusion peut être faite, mais cette fois par l'intermédiaire des canaux tensiodépendants Cav2. Néanmoins, cette diminution de cAMP tend à être contrebalancée par l'organisme à plus long terme, qui va alors en augmenter la production. En conséquence, lors du sevrage le niveau de cAMP est anormalement haut. Sans opioïdes pour équilibrer, l'excès de cAMP induit une augmentation de la concentration en Na^+ et Ca^+ et donc l'hyperexcitabilité neuronale. Ce dernier aspect est en majeure partie responsable des symptômes de dépendance physique.

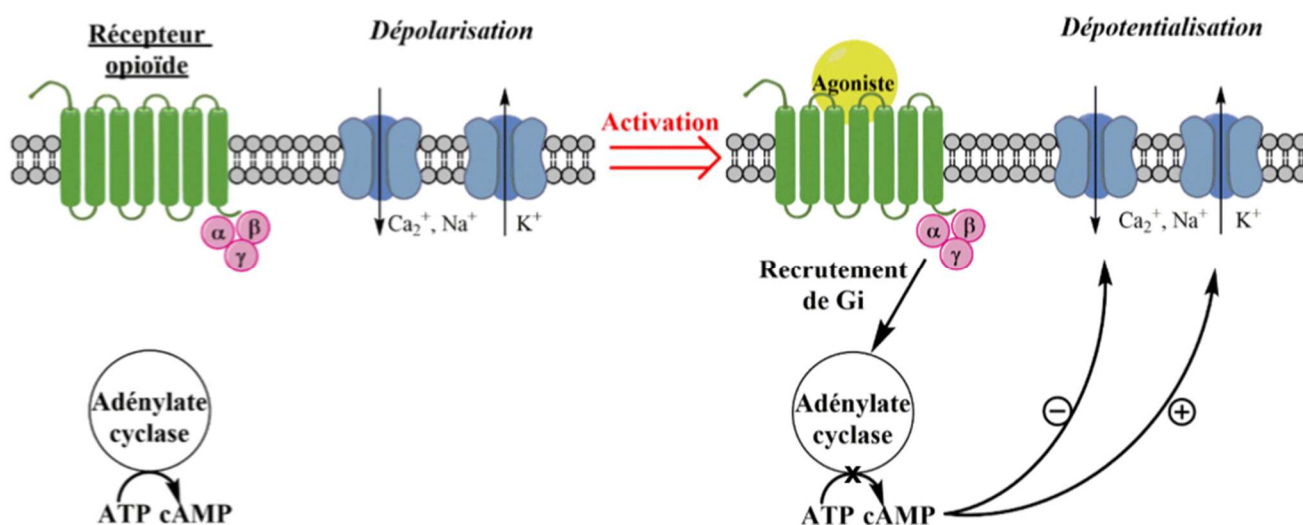


Figure 27. Signal intracellulaire amenant au blocage du signal de la douleur, suite à l'activation des récepteurs opioïdes

Suite à l'activation du récepteur survient quelques secondes ou minutes après, un autre phénomène appelé désensibilisation (**Figure 28**), commun à la plupart des RCPG. Il est premièrement induit par la phosphorylation du récepteur en C-terminal par des protéines kinases appelées GRK (G-protein-coupled Receptor Kinases). Ce mécanisme appelé désensibilisation homologue (c'est-à-dire induite par l'agoniste du récepteur), inhibe l'activation du récepteur par un agoniste. Dans un deuxième temps, la β -arrestine est recrutée par le récepteur phosphorylé. Il s'en suit alors la fixation des protéines cytosoliques AP-2 et clathrine et la formation de puits recouverts de cette dernière, suivi d'une fusion membranaire. Ce

processus appelé endocytose induit l'internalisation du récepteur. La vésicule contenant le récepteur peut ensuite évoluer selon deux scénarios : le recyclage ou la dégradation.²⁴ L'extrémité C-terminale baignant dans le cytosol, peut être déphosphorylée par des phosphatases, provoquant le renvoi plus ou moins rapide vers la membrane via un mécanisme d'exocytose. Le RCPG est alors à nouveau disponible pour l'activation. Dans le deuxième cas de figure, l'endosome peut fusionner avec des lysosomes dont les enzymes lytiques vont dégrader la vésicule et provoquer la perte définitive du récepteur. La vitesse et le ratio de ces deux phénomènes varient d'un récepteur à l'autre ou selon les ligands.¹⁴⁷ Pour ce qui est des récepteurs opioïdes, leur activation excessive favorise la voie destructrice, menant à une sous expression de ceux-ci. Il y a alors une plus faible population membranaire du récepteur, nécessitant une augmentation de la dose nécessaire pour produire l'analgésie. Cette tolérance est un effet notoire des récepteurs opioïdes, et en particulier pour le récepteur MOPr.¹⁴⁸ L'augmentation de la sensibilité des récepteurs NMDA a également été envisagée dans la potentialisation de ce phénomène.⁹⁴

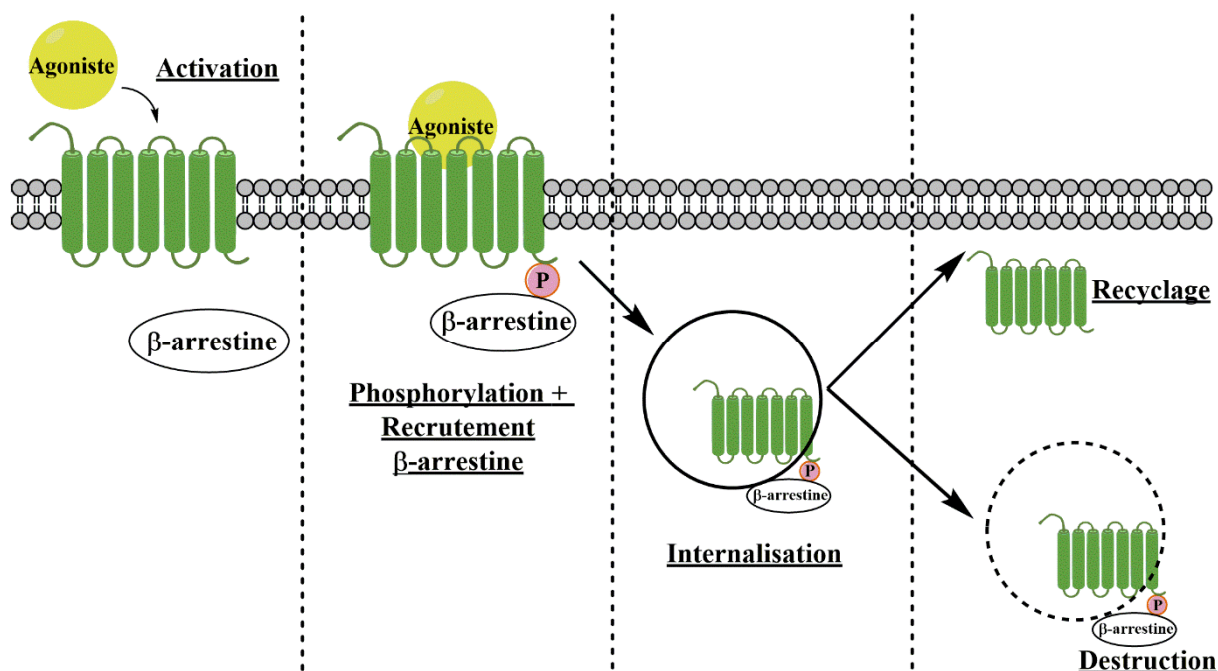


Figure 28. Mécanisme de désensibilisation du récepteur suite à l'activation du récepteur.

Ce processus est donc à éviter dans la mesure du possible. Cela nous amène au concept d'agoniste biaisé, qui est un paradigme de plus en plus émergeant dans le domaine des RCPG. En effet, dépendamment du ligand utilisé, celui-ci peut favoriser l'une ou l'autre des voies intracellulaires (au contraire de la réponse constitutive produite par un ligand endogène). Dans le cadre de notre projet, il serait donc intéressant

d'obtenir des ligands biaisés favorisant la voie liée aux protéines G, au dépend du recrutement de la β -arrestine

I.2.3 Effets secondaires.

À l'échelle cellulaire, tous les processus biochimiques relatés dans le paragraphe précédent sont relativement similaires pour les trois récepteurs, et ne permettent donc pas d'expliquer les effets secondaires. En étudiant le **Tableau 4**, on peut observer que la distribution à travers l'organisme varie grandement d'un récepteur à l'autre, expliquant ainsi la cause de ces effets secondaires.^{109,149}

Tableau 4. Effets thérapeutiques et secondaires associés aux différentes classes de récepteur opioïdes.

Récepteur	Localisation	Effets thérapeutiques	Effets secondaires
MOPr	Cerveau : cortex, thalamus,	Analgésie	Euphorie, dépendance, tolérance, détresse respiratoire, myosis, constipation, sédation
	striatum, substance grise		
	périaqueducale,		
	Moelle épinière		
	Système périphérique		
	Voies intestinales		
DOPr	Cerveau : cortex, striatum,	Analgésie	Euphorie
	bulbe olfactif, amygdale	Antidépresseur	Convulsions (chez les rongeurs)
	Système périphérique	Cardioprotection	
KOPr	Cerveau : hypothalamus	Analgésie Anticonvulsivant Troubles de l'addiction	Dysphorie
	claustrum, substance grise		Hallucinations
	périaqueducale		Myosis
	Système périphérique		Sédation

On retrouve MOPr essentiellement dans la substance grise périaqueducale ou la corne dorsale de la moelle épinière, ainsi que de nombreuses zones du cerveau, ce qui explique sa forte efficacité analgésique.

L'inhibition de l'action péristaltique, lors de l'activation de ce récepteur présent dans le système digestif, provoque la constipation.²⁴ Bien qu'il puisse sembler mineur, cet effet peut se révéler handicapant à long terme.¹⁵⁰ Cependant, cet effet a pu être mis à profit pour traiter les patients atteints de diarrhée sévère avec la création du Lopéramide (**Figure 29**) par les laboratoires Jansen.¹⁵¹ Agoniste sélectif μ , cette molécule est incapable de passer dans le SNC et est donc dépourvue d'activité centrale. Elle agit seulement localement dans l'intestin.¹⁵² Outre ce dernier effet, la sédation peut complexifier la réalisation de tâches sociales ou professionnelles dans la vie de tous les jours.¹⁵³ De plus, combinée à la création de myosis cette association peut rendre la conduite motorisée risquée. Parmi les effets notoires du récepteur MOPr, la détresse respiratoire est un des effets nécessitant une prise en charge d'urgence et est responsable de la plupart des décès par surdose d'opioïdes.¹⁵⁴ Elle est induite par l'activation des récepteurs MOPr dans les centres respiratoires où leurs activations diminuent la sensibilité des récepteurs au CO_2 . L'organisme se retrouve alors incapable de réguler le niveau de CO_2 artériel, ce qui mène rapidement à l'asphyxie.¹⁵⁵ Bien que survenant encore occasionnellement en milieu hospitalier, elle est heureusement aujourd'hui fortement limitée par les différents protocoles cliniques mis en place (augmentation progressive de la dose thérapeutique ou injection à même la colonne vertébrale).^{156,157}

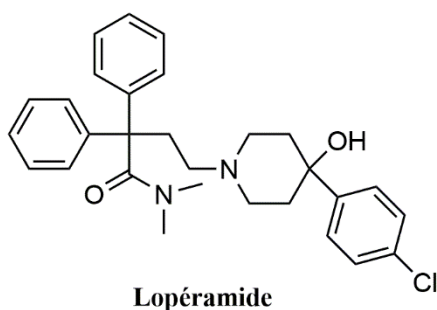


Figure 29. Structure chimique du lopéramide. Agoniste μ dépourvu d'action centrale, utilisée pour le traitement de la diarrhée

A l'instar de MOPr, KOPr produit également une forte sédation et un myosis. Son activation est aussi associée à de forts troubles hallucinatoires indésirables pour un traitement à long terme. En revanche, sa position particulière dans l'organisme semble jouer un rôle dans les troubles de l'addiction et pourrait lui conférer un intérêt thérapeutique dans ce domaine.^{158,159,160}

Concernant DOPr, les effets secondaires liés à celui-ci sont moins nombreux.¹⁶¹ Cependant, quelques convulsions ont pu être observées chez les rongeurs, qu'il est donc nécessaire de limiter.¹⁶² Chez l'humain, ce récepteur se situe dans les régions néocorticales du cerveau et du ganglion basal. Cette dernière région, densément peuplée par les récepteurs GABA, est associée aux troubles de l'humeur, suggérant l'utilisation potentielle de DOPr comme cible thérapeutique dans ce domaine.^{163,164} Plus récemment, des études ont suggéré que les molécules activant DOPr pourraient jouer un rôle cardioprotecteur. En effet, il s'avère que ces molécules seraient capables de mimer un phénomène appelé « preconditionnement ischémique », qui lors d'un accident cardiaque engendrerait des dommages moindres pour les tissus cardiaques.^{165,166} Ce récepteur pourrait aussi jouer un rôle dans la prévention du stress.^{167,168}

Il est important de noter, que bien que possédant chacune une sélectivité relative pour les différents récepteurs opioïdes, les molécules utilisées en clinique, lorsqu'elles sont utilisées en excès, sont capables d'aller activer les autres récepteurs opioïdes ainsi que leurs effets néfastes associés. En cas de surdosage aigu, la Naloxone peut être prescrite en tant qu'antidote afin de bloquer les récepteurs opioïdes.

Ainsi, au vu de la comparaison des effets thérapeutiques/délétères des différents récepteurs, l'activation sélective de DOPr, pourrait permettre de produire de l'analgésie chez les patients, tout en étant dépourvu d'effets secondaires désagréables, voir mortels.^{161,169,170,171} Elle apparaît donc comme une cible thérapeutique de premier choix.^{172,173} La section suivante s'intéressera plus en détail à ce récepteur et sur l'état de la recherche sur celui-ci au laboratoire Gendron ainsi que dans d'autres groupes.

I.3. Les ligands opioïdes DOPr

I.3.1. Les ligands hétérocycliques DOPr

Dans l'espoir de valider l'hypothèse précédente, de nombreuses petites molécules hétérocycliques ont été développées au cours des vingt dernières années.¹⁷⁴ La première fut BW37U86, suivie très rapidement par SNC80, partageant toutes deux un noyau pipérazine.^{175,176} De structure semblable à celle du Fentanyl, leur sélectivité est toute autre, notamment grâce à l'orientation optimale de la fonction diéthylamide pouvant interagir avec les résidus responsables de la sélectivité pour DOPr (Trp284, Leu 300). Bien que ces molécules se soient avérées être très sélectives envers DOPr, des convulsions non létales ont pu être

observées à dose thérapeutique sur les rongeurs, mettant un terme à son développement ultérieur pour un usage thérapeutique.¹⁷⁷ L'origine de ces convulsions est encore sujet à débat, bien qu'il soit supposé qu'elles soient dues à l'activation de la voie β -arrestine.¹⁷⁸ Malgré cela, SNC80 est encore utilisé comme étalon pour la recherche fondamentale. Les mêmes écueils sont apparus pour la plupart des molécules possédant le même noyau.

Récemment, une nouvelle génération de molécules a permis de s'affranchir de ces convulsions, et certains candidats ont avancé en phase clinique I ou II.^{171,179,180} Malheureusement, aucune d'elles n'a pu percer sur le marché. Les raisons avancées seraient un manque d'efficacité chez l'humain.¹⁸¹ Cependant, ces résultats pourraient être dûs à un mauvais modèle expérimental de douleur choisis lors des essais.¹⁷² Certaines de ces molécules sont également à l'étude pour leurs usages antidépresseur ou cardioprotecteur.^{174,181}

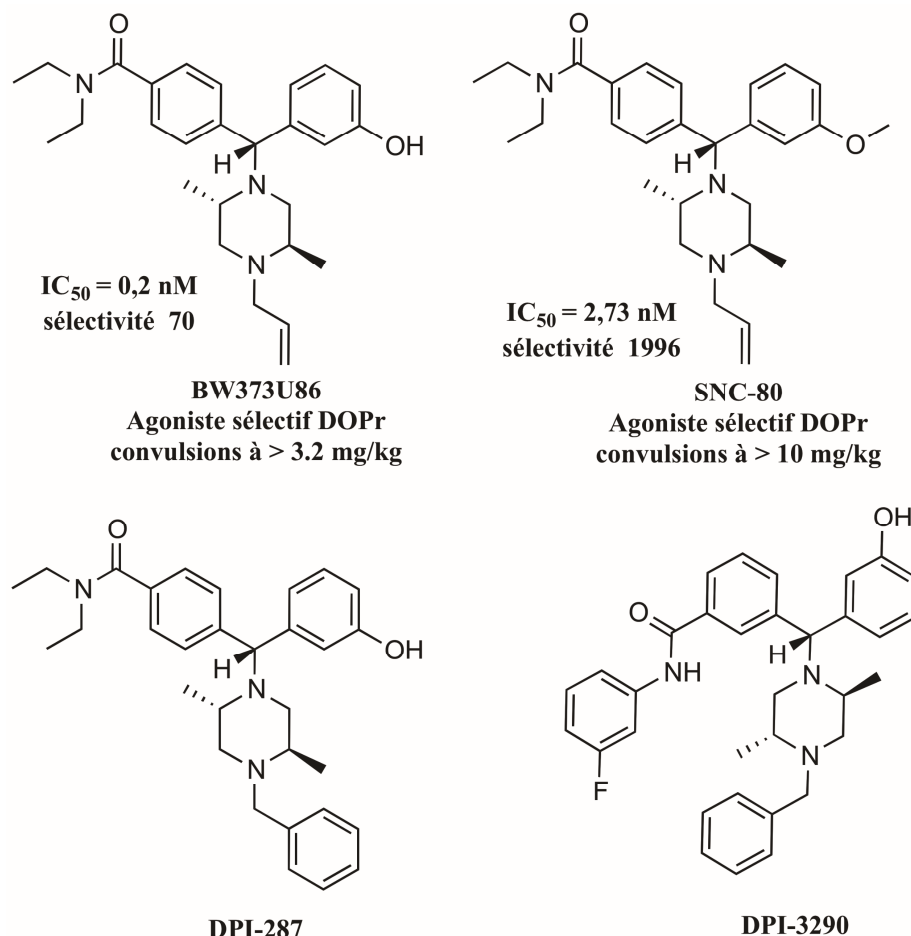


Figure 30. Structure chimique de petits ligands sélectif au récepteur DOPr.

Concernant DPI-3290, cette molécule est un agent bifonctionnel.¹⁸² C'est-à-dire qu'elle est à la fois un agoniste de MOPr et DOPr. Cette propriété en fait un puissant analgésique, dont les effets secondaires reliés à MOPr, sont grandement diminués (en particulier une détresse respiratoire moindre).¹⁸³ Cela nous amène à un concept intéressant : la coopération des récepteurs opioïdes. Il a été constaté que la co-administration d'agonistes MOPr et d'agonistes/antagonistes DOPr permettait une action synergique (effet thérapeutique supérieur à l'addition des effets des ligands pris séparément), tout en limitant le profil d'effets secondaires, dont la diminution des effets de tolérance et dépendance physique.^{181,184} Ce phénomène s'expliquerait par la formation favorisée de dimère MOPr/DOPr.^{185,186} Cette observation a mené au développement de plusieurs ligands bivalents capables de lier en même temps les deux récepteurs du dimère. Un exemple notable est le MDAN-21 développé par Porthoghese, constitué d'une partie Naltrindole, antagoniste DOPr et d'une partie oxymorphone agoniste MOPr.¹⁸⁷ Ces deux hémisphères liés entre eux à leur partie adresse par un espaceur de taille adéquate (21 atomes) permettent de présenter leur partie message dans les deux récepteurs du dimère. Ce composé démontre une activité chez l'animal et pourrait être envisagé pour le traitement de la douleur chronique.¹⁸⁸

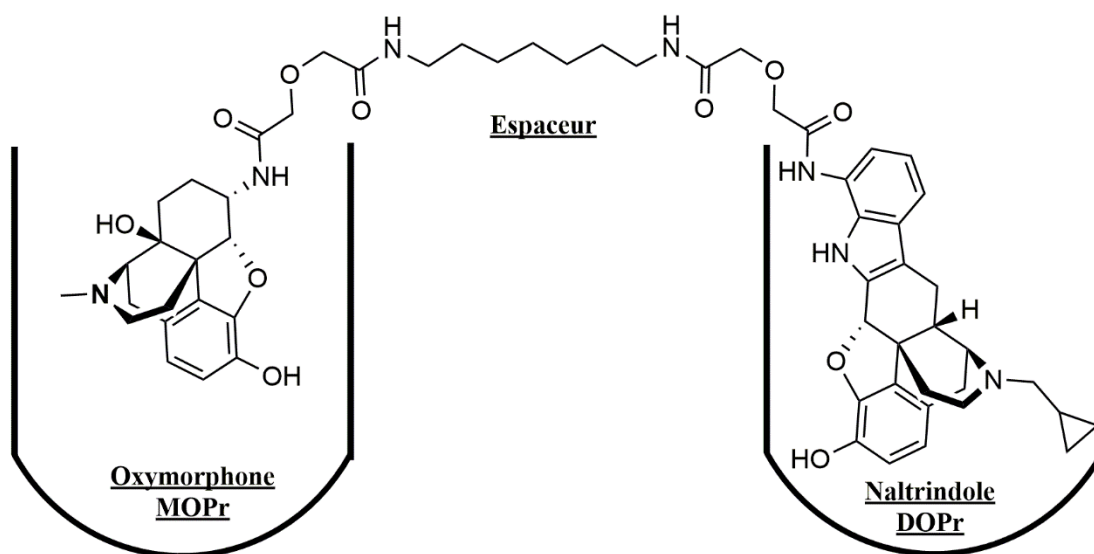


Figure 31. MDAN-21, agent bivalent MOPr/DOPr

Une autre application de ce concept est la réalisation de ligands polyvalents, qui à la différence des ligands bivalents constituées de deux motifs reliés par un espaceur, possèdent une seule molécule capable de lier les deux récepteurs, mais avec des activités différentes.¹⁸⁹ La plupart de ces molécules polyvalentes sont constitués autour du noyau Dmt-Tic (**Figure 32**), tel que le ligand Dmt-Tic-Phe-Phe-NH₂ du paragraphe précédent.^{190,191} L'acide aminé Dmt produit l'activité sur MOPr, tandis que le noyau Tic pointé vers le tryptophane²⁸⁴ de DOPr engendre la réorganisation de celui-ci vers son état inactif.¹³⁴ Ce motif peut ensuite être modifié en C-terminal avec l'ajout d'autres acides aminés ou de motifs hétérocycliques afin de moduler l'adresse du récepteur.^{192,193} D'autres ligands visant l'association de récepteurs opioïdes avec d'autres récepteurs sont également à l'étude.¹⁹⁴

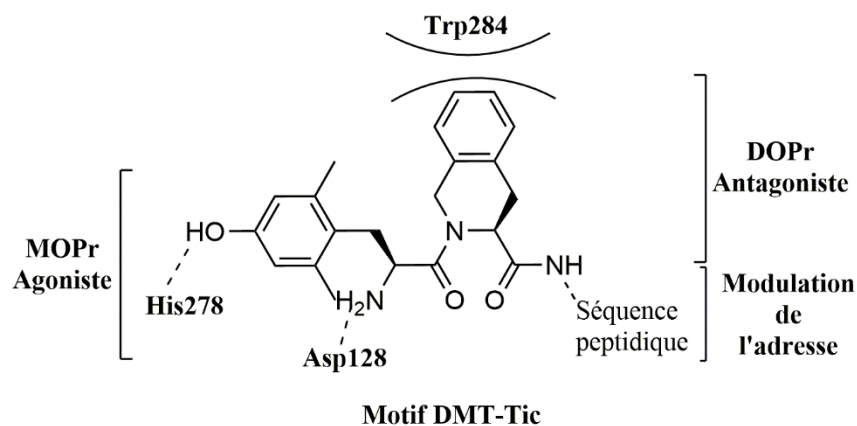


Figure 32. Le motif Dmt-Tic pour la mise au point d'agent polyvalent MOPr/DOPr

I.3.2. Les ligands endogènes DOPr

Afin de remédier aux différents problèmes avancés, une solution serait de s'intéresser aux ligands endogènes de DOPr : les enképhalines. Rapidement après la découverte des récepteurs opioïdes, les chercheurs se sont intéressés à connaître la nature des ligands endogènes, pour amener à la découverte de la Leu-enképhaline et de la Met-Enképhaline (**Figure 33, haut**) en 1975, extraits de l'hypophyse de porc.¹⁰⁶ Ces enképhalines, synthétisées à partir du gène proenképhaline sont impliquées dans de nombreux processus biologiques (la met-enképhaline est d'ailleurs appelée la molécule du coureur, en

référence à sa délivrance dans le corps suite à un effort physique).^{109,195} Ces deux pentapeptides varient seulement sur leur cinquième résidu. Ils ont pour séquence Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu (Leu-Enképhaline), et Tyr-Gly-Gly-Phe-Met (Met-enképhaline). Tout comme les opioïdes classiques, le concept de « message-adresse » s'applique. D'un point de vue structure-activité, ces deux peptides peuvent être décortiqués en trois parties : La tyrosine joue le rôle de « message » (noyau tyramine), tandis que la phénylalanine et la leucine/méthionine remplissent la fonction « adresse » et vont être responsables de la sélectivité entre les différents récepteurs. Les deux glycines quant à elles, sont responsables de l'enroulement des peptides dans leur conformation active. La Leu-enképhaline est rapportée comme étant plus sélective envers DOPr (jusqu'à 5 fois plus), que la Met-enképhaline qui elle se lie à DOPr et MOPr de façon égale, rappelant une fois de plus l'importance du cinquième résidu pour la discrimination entre les deux récepteurs.¹¹⁹⁵

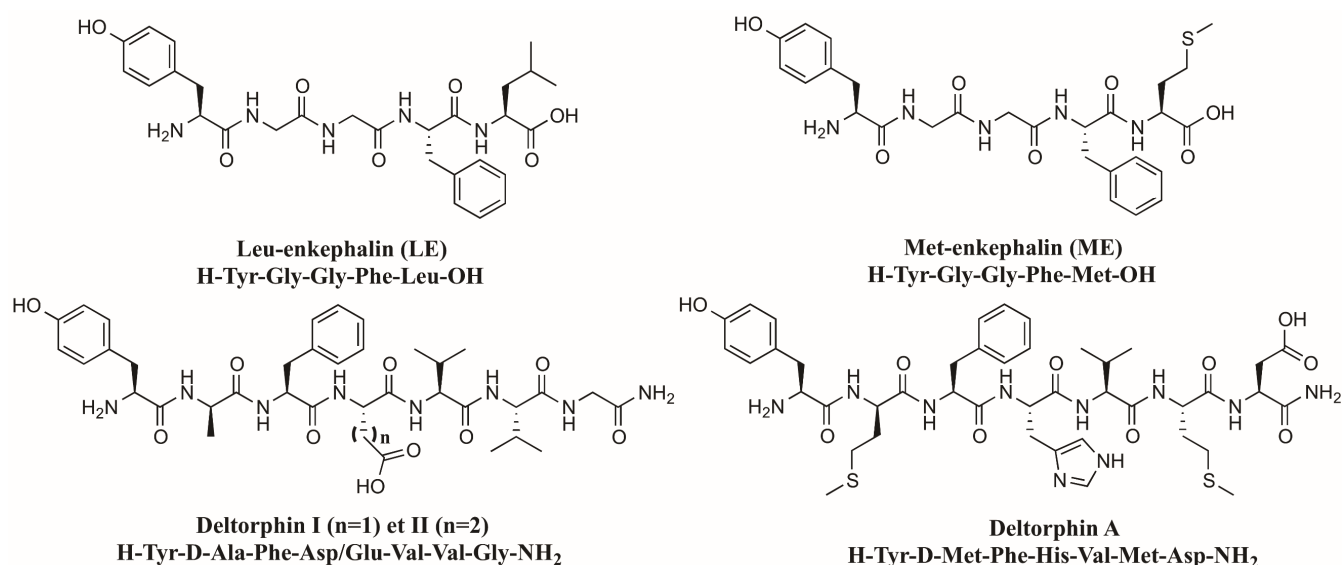


Figure 33. Structure chimiques de plusieurs peptides endogènes (humain ou animal) sélectifs au récepteur DOPr

D'autres ligands considérés endogènes sont également retrouvés chez d'autres espèces que l'être humain. En effet certains types de grenouille produisent naturellement des peptides appelés Deltorphines A, I, ou II (**Figure 33, bas**).¹⁹⁶ Contrairement à notre organisme incapable de synthétiser des acides aminés de stéréochimie *D*, ces heptapeptides contiennent un acide aminé *D* en position 2, rendant ce type de peptide beaucoup plus intéressant au niveau pharmacocinétique (autant la stabilité plasmatique que la perméabilité membranaire).^{197,198} Des trois variantes de cette famille, la deltorphine II (ou B) est celle qui est la plus sélective pour DOPr.¹⁹⁹ D'un point de vue structure-sélectivité, le résidu carboxylate en

position 4, pourrait former les mêmes interactions que celui de la Leu-enképhaline avec Arg291, tandis que les chaînes latérales aliphatiques en position 5 et 6 se prolongeraient dans la poche hydrophobe au voisinage de Leu300.²⁰⁰ Cette grande sélectivité est d'ailleurs la raison pour laquelle la deltorphine II est utilisée en routine dans la recherche sur DOPr, en tant que standard.

Travailler avec ces peptides naturels a plusieurs avantages : ils sont non toxiques (ce qui est non négligeable, ce paramètre étant la raison des arrêts pour la plupart des molécules en phase préclinique), relativement sélectifs (jusqu'à 5 fois), et très faciles à synthétiser (permettant ainsi des études structures-activités beaucoup plus rapides).²⁰¹

Malheureusement, ils possèdent aussi la plupart des inconvénients propres aux peptides. Premièrement, étant très polaire, il leur est très difficile de passer la barrière hémato-encéphalique (BHE).²⁰² La BHE est une membrane phospholipidique, composée de cellules endothéliales avec leurs jonctions serrées. Elle est chargée de protéger le système nerveux central de la plupart des molécules exogènes et autres toxines, tout en laissant passer les éléments nécessaires au cerveau. Le filtrage ultra sélectif de cette barrière, est un obstacle majeur pour la plupart des traitements relatifs au SNC.²⁰³ La diffusion passive (sans l'utilisation de transporteurs) des molécules qui nous intéressent est quand même possible à condition que ladite molécule ait une affinité suffisante avec les lipides. Cette lipophilicité est mesurée de façon simpliste par le $\log D_{7,4}$ représentant la proportion de composé présent dans l'octanol par rapport à une phase aqueuse à pH physiologique, ainsi que par l'aire de la surface polaire totale (tPSA). Cette valeur théorique est calculée à partir de la sommation de la surface de tous les atomes polaires d'un composé. Il est recommandé pour un composé actif sur le SNC de se situer entre 2 et 5 pour le $\log D_{7,4}$ et en dessous de 90 \AA^2 pour la tPSA.²⁰⁴ Avec des valeurs de -0,8 et 199 \AA^2 pour les enképhalines, on est bien loin du compte. Un autre mode de transport à travers le cerveau est possible via des transporteurs transmembranaires, malheureusement aucun de ces transporteurs connus à ce jour, ne reconnaît ces peptides endogènes.²⁰⁵ Il est à noter que la Leu-enképhaline est également un substrat de glycoprotéine P (P-gp) chargée de transporter les molécules hors de la BHE.²⁰⁶ Donc, la seule solution à ce jour pour la livraison de ces peptides au cerveau, est l'injection de telles molécules par voie intrathécale (directement dans la moelle épinière), ce qui s'avère très contraignant pour les patients.

La deuxième difficulté, et non la moindre, provient du fait que les quelques molécules qui réussissent à passer la BHE, sont très rapidement dégradées par les enképhalinases, aminopeptidase et autres protéases

moins sélectives.^{207,208,209,210} La demi-vie très courte de ces enképhalines (environ 2 min), rend leur usage thérapeutique impossible.²¹¹

Afin de remédier à ces limitations, différentes stratégies ont été mises à l'œuvre, avec plus ou moins de succès. Elles seront l'objet de la prochaine section.

I.3.3. Les peptidomimétiques d'enképhalines

Tout de même intéressées par le potentiel de la Leu-enképhaline, les équipes de recherche ont réalisé différentes modifications sur son squelette. Cette approche consistant à moduler les propriétés pharmacodynamiques ou pharmacocinétiques d'un peptide parent (ici la Leu-enképhaline) par diverses modifications (naturelles ou non) sur les chaînes latérales, les liaisons amides de la séquence, ou les extrémités du peptide, est nommée peptidomimétisme (**Figure 34**).^{212,213} La connaissance des informations structurales du peptide relatives à son activité biologique peut être exploitée afin d'en renforcer ses composantes bénéfiques (rigidification de la conformation active du peptide par macrocyclisation), ou la création d'interactions supplémentaires avec le récepteur. Parmi les différentes modifications possibles, l'une des plus commune et facile à réaliser est le remplacement d'un des acides aminés par son stéréoisomère *D*, plus difficilement reconnu par les enzymes, permettant ainsi d'augmenter la stabilité dans l'organisme.²¹⁴ Une autre modification des chaînes latérales répandue provient de « l'alanine scan » où chacun des acides aminés de la séquence est remplacé par une alanine.²¹⁵ En effet cet acide aminé étant biologiquement « neutre » (peu encombrant, pas de polarité particulière), tout en étant capable de conserver la stéréochimie de la position et donc le repliement du peptide, son influence sur l'activité permet d'évaluer l'importance de chacune des chaînes latérales des acides aminés échangés, sur l'activité biologique. Les liaisons amides étant la principale cible des enzymes, leur remplacement par des fonctions chimiques occupant le même espace et formant les mêmes conformation (trans ou cis) permet également de réduire les risques de dégradation, tout en évaluant l'importance de celles-ci pour la conformation active du peptide.²¹⁶ Quand cela est possible, l'introduction de dialcyle glycine permet de rigidifier le ligand dans sa forme active (l'effet Thorpe-Ingold induit par ces deux groupements alkyls, diminue l'énergie nécessaire au ligand pour se replier de façon adéquate).²¹⁷

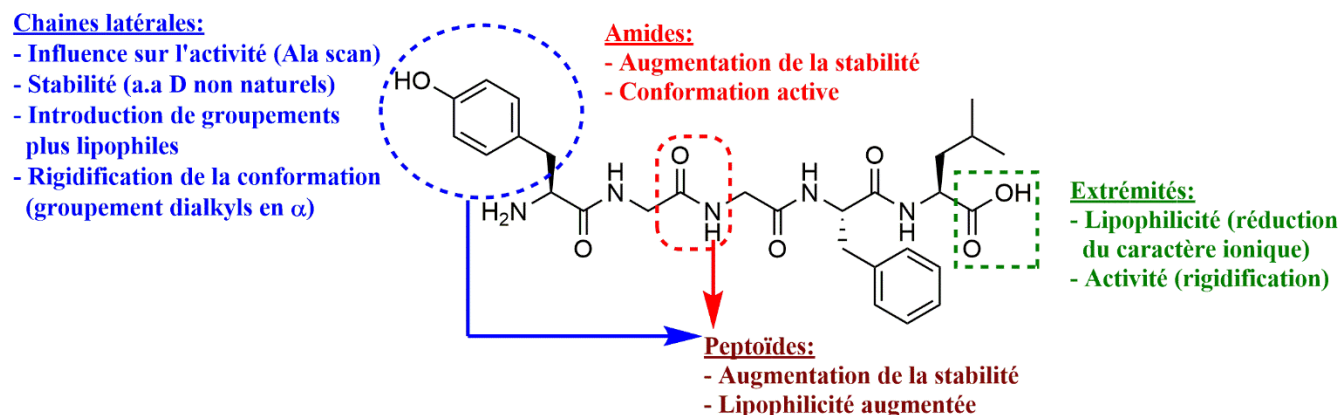


Figure 34. Résumé des différentes approches de peptidomimétisme. La Leu-Enképhaline est représentée à titre d'exemple.

Finalement, la modification des extrémités du peptide, en altérant leur état d'ionisation, si la cible biologique le permet peut permettre d'augmenter la lipophilicité du composé. Cette stratégie peut par exemple être mise à profit dans la création de prodrogues qui seront ensuite clivées dans l'organisme. Au vu de l'importance des sites ioniques mentionnés dans les sections précédentes, ils doivent être conservés dans le cas des peptides opioïdes.

À la croisée entre les modifications sur les chaînes latérales et les amides, les peptoïdes où la chaîne latérale est déplacée sur l'azote de l'amide, peut permettre d'augmenter grandement la perméabilité des peptides ainsi que leur stabilité.²¹⁸ Cette stratégie requiert cependant une très bonne connaissance de la relation structure-activité de la molécule afin de s'assurer que ce changement de position soit autorisé, et met en jeu un degré de complexité synthétique supérieur. Un résumé des modifications possibles et de leurs effets est présenté **Figure 34**.

Cette campagne de peptidomimétisme sur la Leu-enképhaline a menée à la création de plusieurs analogues aux propriétés améliorées (**Figure 35**), dont l'exemple le plus notoire est la *D*-Alanine²-*D*-Leucine⁵ Enképhaline (DADLE).²¹¹ Ces modifications en position 2 et 5 du peptide ont permis d'améliorer la stabilité de ce peptide de façon significative, tout en augmentant légèrement la lipophilicité.²¹⁹ Ce composé se démarque également par une sélectivité DOPr augmentée (94 fois plus que la Leu-Enképhaline).²²⁰ Cette sélectivité est supposément due à l'action synergique des deux acides aminés *D*.²²¹ En effet, la *D*-Alanine étant aussi présente dans la séquence du DAMGO en position 2,

cette modification seule ne semble pas jouer de rôle sur la sélectivité. Bien qu'améliorée, la valeur de $\log D_{7,4}$ du DADLE n'est pas encore suffisamment haute pour l'envisager en tant que médicament. Par contre, son injection par voie intrathécale chez l'humain démontre un degré d'analgésie similaire à la morphine.²²²

L'addition de thréonine en position 6 dans les peptides DSLET et DTLET semble avoir également un rôle positif dans la sélectivité (600 fois plus sélectif à DOPr dans le cas du DTLET), probablement par la formation d'interactions supplémentaires dans la partie adresse du récepteur.^{223,224} Le composé BUBUC dérivé du DSLET, auquel a été greffé des groupement tert-Butyl sur Cys2 et Thr6, a une sélectivité encore plus grande (1000 fois plus sélectif à DOPr).²²⁵ Leurs excellentes sélectivités en font des outils souvent utilisés en recherche fondamentale pour la compréhension des mécanismes de douleur impliquant DOPr.

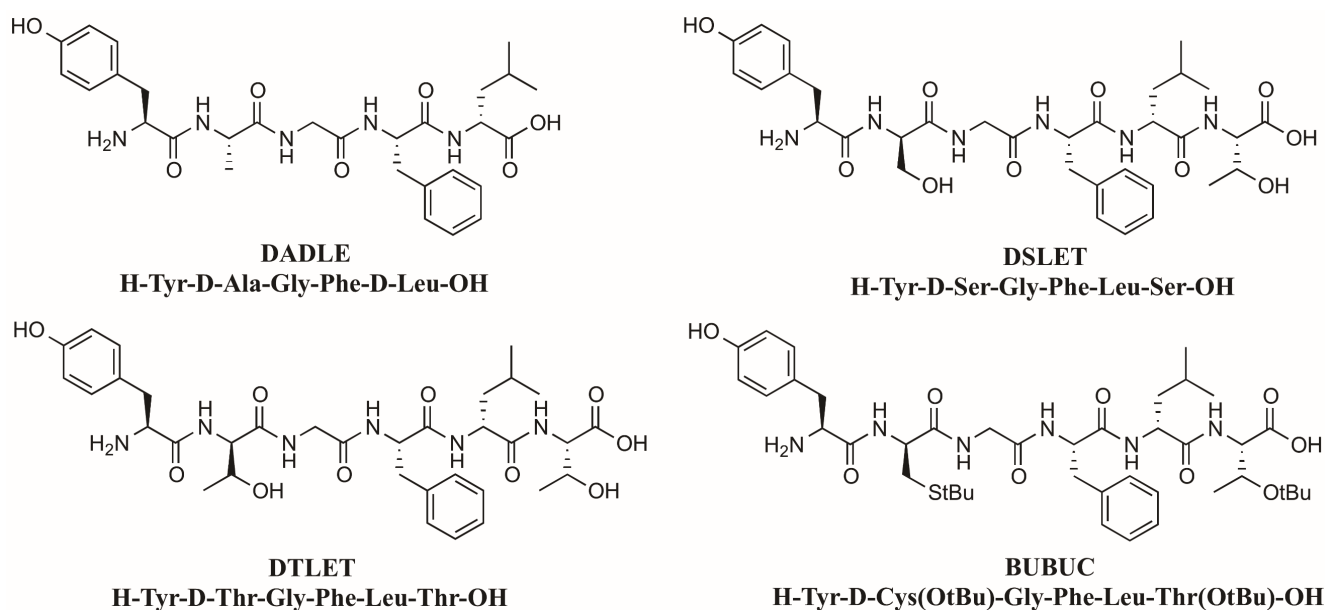


Figure 35. Structures chimiques de quelques peptidomimes linéaires de la Leu-Enképhaline

En position 1, différentes approches ont été essayées, révélant la nécessité de conserver la fonction phénol. Il existe toutefois quelques exceptions tels que le remplacement de la tyrosine par le 4'[N-((4'-phenyl)phenethyl)carboxamido]phénylalanine (Bcp) ou par un 4'[N-((2'-naphtalene-2-yl)phenethyl)carboxamido]phénylalanine (2-Ncp), où non seulement le noyau aromatique est compatible avec le récepteur, mais résulte aussi en de puissants agonistes.^{226,227} L'ajout de méthyles en position 2, 5 du phénol (2,5-Dimethyltyrosine, Dmt) rigidifie la structure en limitant le nombre de conformations

possibles pour ce noyau et permet d'augmenter l'affinité des ligands de façon non sélective.²²⁸ Préférentiellement, l'ammonium en N-terminal doit être primaire afin de maximiser les chances d'interactions avec Asp128. Toutefois, une équipe a récemment démontré qu'il était possible d'acétyler cet amine, à condition de remplacer le phénol de la tyrosine par un indole (tryptophane).²²⁹ Cette modification non seulement a conservé l'activité mais a résulté en des composés bien plus lipophiles. Comme il l'a été dit un peu plus tôt, la disubstitution de l'amine terminale par des groupements encombrants convertit les ligands en antagonistes, il faut donc agir avec précaution lors du changement fonctionnel de cette amine. La substitution de la phénylalanine en position 4 par un fluor ou des groupement électroattracteurs en para, semble également favoriser l'affinité des composés pour le récepteur DOPr.²³⁰

Une autre approche populaire est la macrocyclisation des enképhalines. En effet cette stratégie, largement utilisée pour plusieurs autres cibles biologiques présente plusieurs avantages : l'augmentation de la perméabilité en diminuant la surface du ligand et amélioration de la stabilité, empêchant la reconnaissance des molécules par les protéases.²³¹ Elle s'applique d'autant plus que la Leu-Enképhaline est supposée avoir un coude β dans sa conformation active. Le macrocycle d'enképhaline le plus célèbre est la *D*-Penicilamine²-*D*-Penicilamine⁵ Enképhaline (DPDPE), où les chaînes latérales de ces deux pénicillamines en position 2 et 5 sont reliées via un pont disulfure.²³² La position optimale du gem-diméthyle en position 5 dans le voisinage de Leu300, lui confère une très bonne sélectivité (1200 fois). Encore une fois, une amélioration de la stabilité a pu être observée. Bien que prometteuse *in vitro*, l'activité analgésique de cette molécule chez l'animal fut décevante, probablement en raison d'une faible perméabilité dans la BHE.²³³ Peu de temps après, l'équipe du professeur Mosberg a mis au point une série de tetrapeptides desquels ressortent le JOM-13 et le JOM-6, inspirés de cette séquence, et également très sélectifs respectivement pour DOPr et MOPr (637 fois pour DOPr et 9 fois pour MOPr).^{234,235} Il en ressort que la taille de l'espaceur entre les deux soufres influence grandement l'affinité pour les deux récepteurs. Ces composés, bien qu'ils ne soient pas utilisés en tant que traitement, sont des outils très utilisés en recherche fondamentale, notamment pour les tests de radiocompétition.

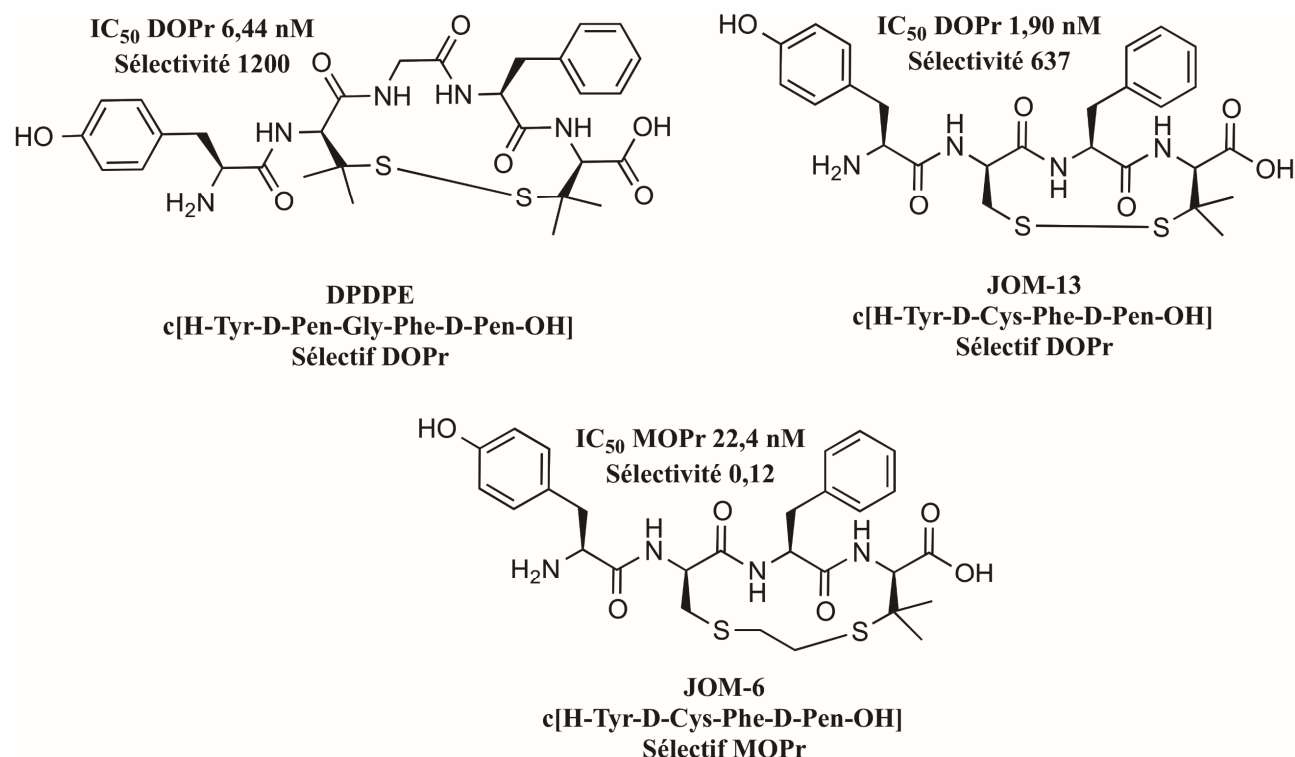


Figure 36. Structures chimiques de quelques analogues cycliques de la Leu-Enképhaline

Bien qu'ayant grandement amélioré la pharmacodynamique et la pharmacocinétique des molécules endogènes, ces modifications sont encore insuffisantes pour envisager un usage thérapeutique. C'est ici que les travaux de notre laboratoire entrent en jeu.

I.4.Travaux précédents sur le récepteur DOPr au labo Dory/Gendron.

Le laboratoire du Professeur Louis Gendron possède une expertise sur les récepteurs opioïdes et en particulier pour le récepteur DOPr, lequel est considéré comme une cible thérapeutique viable. Les travaux du laboratoire portent sur la compréhension des mécanismes de la douleur et du rôle de DOPr dans ceux-ci. Le Professeur Yves Dory, pour sa part possède une expertise en synthèse organique/peptidique et modélisation. À partir de 2007, les deux équipes ont souhaité mutualiser leurs connaissances afin d'améliorer la structure de la Leu-enképhaline pour en tirer une meilleure compréhension de sa structure bioactive, l'objectif à plus long terme étant de parvenir à développer un

ligand sélectif à DOPr. Celui-ci devrait être suffisamment puissant, en plus de posséder des propriétés pharmacocinétiques améliorées.

1.4.1. Problématique initiale

Afin de pouvoir apporter les modifications adéquates à la structure de la Leu-enképhaline, il est essentiel de déterminer sa conformation active. Mis à part le cristal de DOPr lié à Dmt-Tic-Phe-Phe-NH₂ dans DOPr, aucune structure 3D d'un peptide dans ce récepteur n'a été élucidé.¹³³ Cette molécule étant un antagoniste, les informations apportées bien que très utiles sont insuffisantes pour l'élaboration rationnelle d'un agoniste efficace. Plusieurs très bons modèles ont été proposés au fil des années par les équipes du professeur Schiller ou du professeur Mosberg, mais ne concernent que des analogues cycliques de Leu-enképhaline.^{131,235,236,237} Les peptides linéaires de par leur nature, sont extrêmement flexibles, au contraire des dérivés macrocycliques qui présentent un nombre de conformations bien plus limités. Cette diversité conformationnelle complique grandement leur prédiction.

Il existe à l'heure actuelle quatre cristaux regroupant huit conformations de la Leu-enképhaline, parmi lesquelles les schémas les plus fréquents sont la forme étendue, coudée ou doublement coudée (**Figure 37**).²³⁸ Il convient avant tout de rappeler que ces structures ne reflètent pas nécessairement la conformation active du peptide. En effet, alors que les structures en solution sont stabilisées majoritairement par des interactions intermoléculaires avec le solvant de cristallisation réparti de façon homogène, la molécule dans son récepteur forme certaines interactions à des endroits spécifiques. Les deux entités s'auto-accommodent alors entre elles pour former un complexe dont les composantes individuelles, lorsque considérées séparément, ne sont pas obligatoirement dans leur état le plus stable. Ces structures cristallographiques indiquent toutefois une tendance. Des trois différents repliements, la forme coudée est celle dont la structure est la plus proche des hypothèses structurales émises par la littérature.^{239,240,241} Malgré les différentes technologies mises en œuvre pour son élucidation (Dichroïsme circulaire, RMN, ...), la structure active de la Leu-enképhaline suscite encore des débats. C'est avec cette problématique en tête que notre laboratoire a proposé plusieurs stratégies d'études de structures-activités, afin d'apporter certains éléments de réponses. La première d'entre elles est « l'amide scan ».



Figure 37. Structure 3D de la Leu-enképhaline. Forme étendue (en rose), repliée (en vert), doublement repliée (en marron)

I.4.2. « Amide scan » de la Leu enképhaline

Traditionnellement, les chimistes médicaux ont recours à « l’alanine scan », qui consiste à remplacer un à un chacun des acides aminés d’une séquence peptidique, par une alanine, l’acide aminé étant le plus « neutre » biologiquement tout en conservant les composantes stéréochimiques. En procédant ainsi, il est possible d’étudier l’influence de chacune des chaînes latérales sur l’affinité d’un peptide. De manière similaire, l’amide scan, consiste à remplacer chacune des liaisons amides par un isostère, soit un groupement de taille similaire. En effet, la conformation active d’un peptide étant en grande partie dépendante du repliement de son squelette, cette technique trouve tout son sens si l’on souhaite déterminer cette dernière. Les isostères de la fonction amide sont des fonctions chimiques ayant une taille et des propriétés électroniques semblables à celle-ci. De plus, l’introduction de ces fonctions non naturelles peut également améliorer grandement la stabilité des peptides modifiés résultants.

Si l'on observe la fonction amide, on peut voir qu'elle est constituée de deux composantes électroniques : un caractère donneur de pont-H par le NH et un caractère accepteur de pont-H par les deux doublets non liants de l'oxygène. Ainsi, les différents isostères proposés ont été définis en fonction de leur caractère donneur ou accepteur (**Figure 38**).

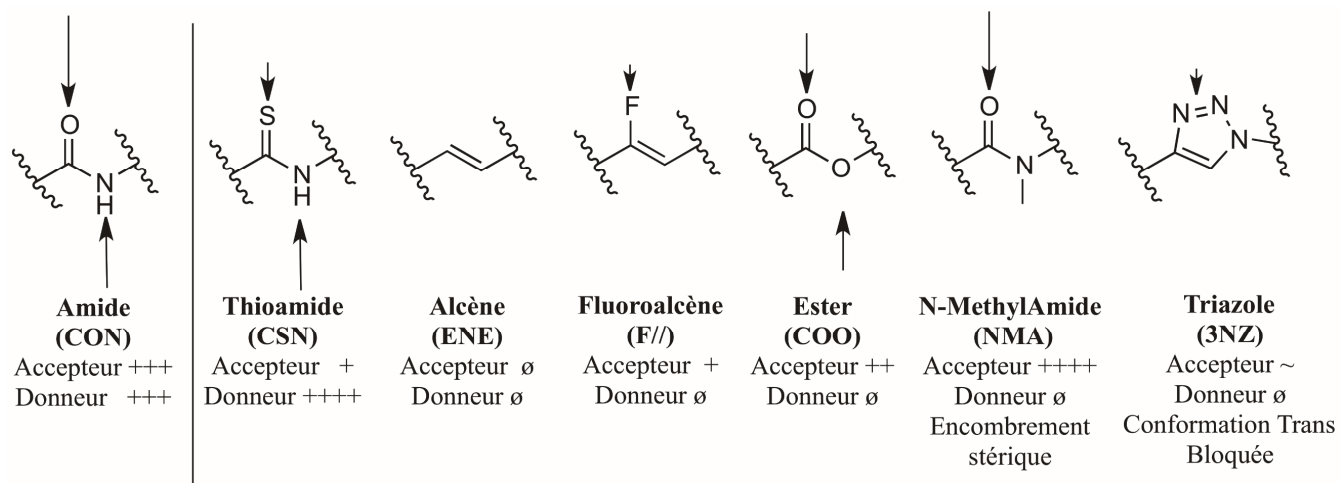


Figure 38. Caractère donneur et/ou accepteur de pont-H des différents isostères d'amides

Aux cours de leurs travaux de doctorat ou de maîtrise, Arnaud Proteau-Gagné, Guillaume Langlois et Jean-François Nadon,^{242,243} ont remplacé chacun des quatre amides par un alcène (ENE) dépourvu de liaisons hydrogènes;²⁴⁴ par un thioamide (CSN), à la fois donneur et accepteur; par un ester (COO), agissant seulement en tant qu'accepteur; par un *N*-methyamide (NMA), qui tout comme l'ester est uniquement accepteur,²¹⁶ en plus d'introduire une gêne stérique; par un triazole (3NZ), assez proche structuellement de l'amide,²⁴⁵ quoique faiblement accepteur et dépourvu de caractère donneur; ou par un fluoroalcène (F//) semblable à l'alcène,²⁴⁶ à la différence qu'il possède un caractère légèrement accepteur par son atome de Fluor, qui mime l'atome d'oxygène de l'amide ($d_{C-O} = 1,52 \text{ \AA}$, $d_{C-F} = 1,47 \text{ \AA}$). Il a alors été supposé que le remplacement d'une liaison amide intramoléculaire impliquée dans le repliement du ligand, résulterait en une baisse d'affinité modérée, tandis que l'inhibition d'une liaison capitale avec le récepteur, produirait une chute drastique de l'affinité. En procédant ainsi, l'équipe a pu établir une cartographie précise des interactions indispensables de la Leu-enképhaline.

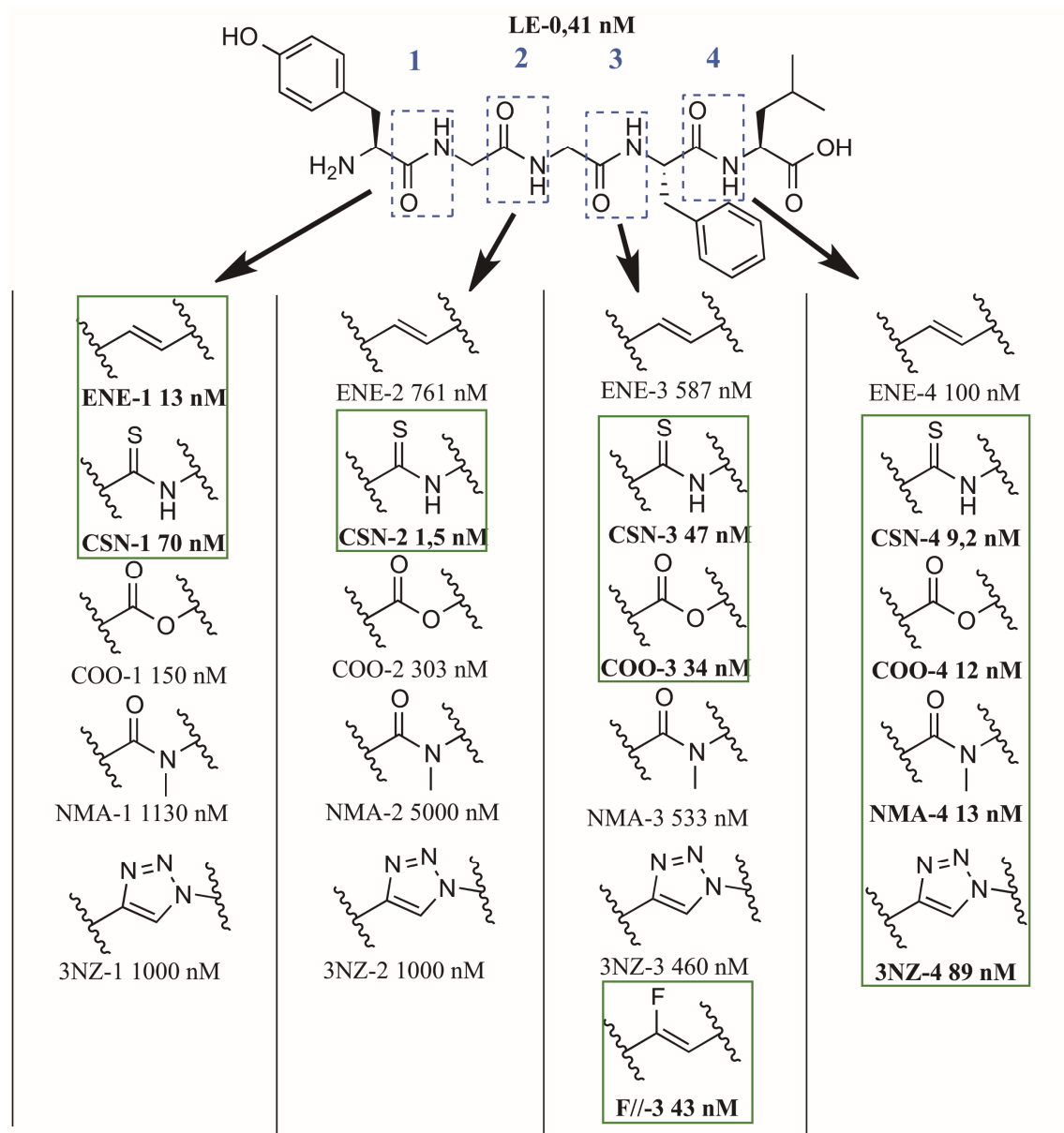


Figure 39. Résumé des différentes modifications d'amides de la Leu-Enképhaline et leur influence sur l'affinité pour DOPr.

La position 1 ne semble pas impliquée dans une interaction capitale avec le récepteur, en témoigne la relative tolérance pour l'alcène. En position 2, seul le thioamide se lie à DOPr, suggérant l'implication d'une liaison H de type donneur. Pour le troisième amide, seules les fonctions possédant un atome accepteur ont une affinité acceptable. Il est aussi intéressant de constater que l'affinité augmente avec le pouvoir accepteur des fonctions (COO>CSN>F/-). Le *N*-méthylamide, lui ne se lie pas, en raison d'une

possible gêne stérique. En dernière position, un accepteur est encore nécessaire, bien que ce phénomène soit plus atténué que pour les autres positions, avec des valeurs proches de la Leu-enképhaline. La valeur moindre du triazole peut être imputée à sa taille supérieure, comparée à l'amide.

Tableau 5. Résumé du caractère donneur/accepteur des amides de la Leu-enképhaline

Amide 1	Amide 2	Amide 3	Amide 4
Liaison H	Donneur H	Accepteur H	Accepteur H
Absente	Favorable	Favorable	Favorable

En plus d'améliorer la stabilité et la perméabilité du peptide, ces résultats ont permis de poursuivre la réflexion plus loin, et de proposer un modèle de la bio-conformation de la Leu-enképhaline. Pour cela, le Pr Dory est parti de la structure cristallographique DOPr 4EJ4,¹²¹ et a introduit progressivement des ligands DOPr de taille croissante, afin de pouvoir accommoder la Leu-enképhaline, bien plus volumineuse que le naltrindole natif, dans la cavité du récepteur. Ces ligands ont été amorcés dans le récepteur par docking induit (Induced Fit Docking, IFD), en laissant un degré de liberté aux résidus de la cavité du site actif, afin de prendre en compte le comportement naturel des complexes récepteurs-ligands. Après plusieurs essais, la distance minimale dans laquelle les résidus du récepteur ont été laissé libre de bouger, a été déterminée à 15 Å. L'étape suivante a consisté à prendre les poses de la Leu-enképhaline qui correspondent aux conclusions trouvées lors de l'amide scan (**Figure 40**).

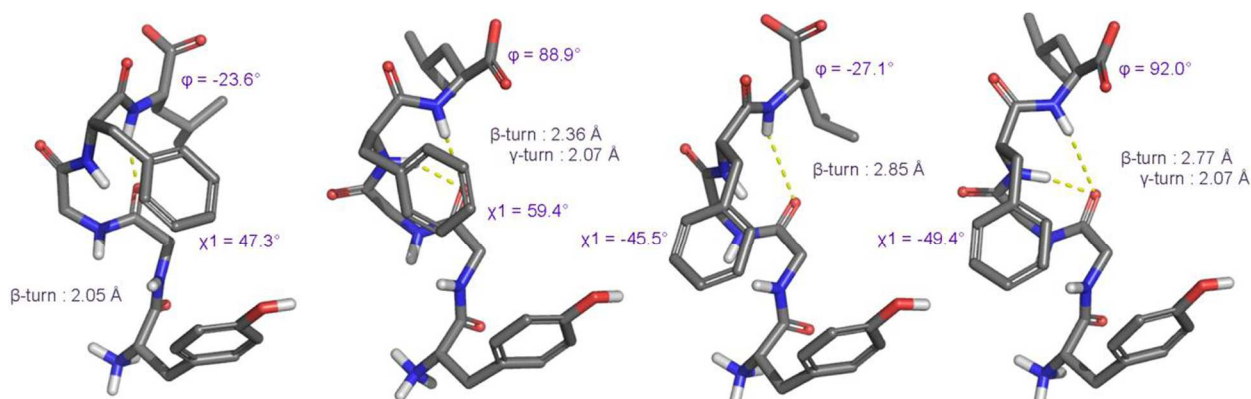


Figure 40. Structures de la Leu-Enképhaline amarrée dans le récepteurs DOPr, ayant obtenues les meilleurs scores d'Induced Fit Docking (IFD) et leurs énergies calculées par mécanique moléculaire (OPLS) ou par méthode DFT (MO6-2X).

Plusieurs cycles d'amarrage, ont finalement produit une conformation relativement proche du cristal GEWWAG (**Figure 37**, gauche). La disposition obtenue, en plus de répondre aux exigences de l'amide scan, est aussi en accord avec plusieurs observations rapportées dans la littérature. L'amine terminale forme bien une interaction avec Asp128, tandis que le phénol forme un pont-H avec His278 via deux molécules d'eau. Pour la partie adresse, le carboxylate se lie à Arg291, et la chaîne latérale de la leucine est dirigée vers la poche hydrophobe autour de Leu300, supposée responsable de la sélectivité. Dans le présent modèle, la seule incertitude porte sur la position du cycle aromatique de la phénylalanine. Bien que dans le modèle de la DPDPE, les deux cycles aromatiques soient également proches dans l'espace, le fort degré de liberté de cette chaîne latérale, ne nous permet pas de le prédire avec certitude.^{247,248} Il est même fort possible que le noyau aryle de Phe⁴, change d'emplacement d'un peptide à un autre. Cette hypothèse est d'ailleurs consolidée par les travaux de Goodman qui affirme qu'une distance de moins de 10 Å entre les deux noyaux aromatiques conférerait au peptide une sélectivité pour DOPr.^{249,250,251}

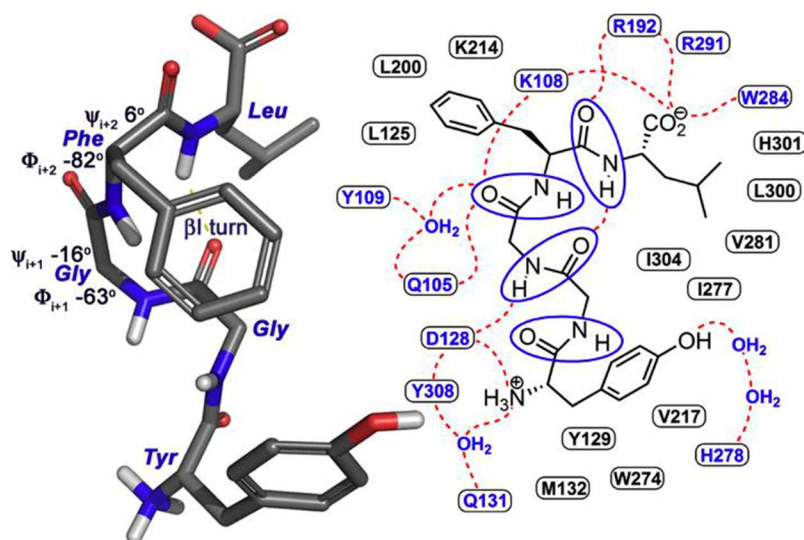


Figure 41. Structure active proposée de la Leu-Enképhaline et son schéma d'interactions avec le récepteur DOPr.

I.4.3 Étude de la chaîne latérale du 5^{ème} résidu.

De la même façon que le naltrindole, la Leu-enképhaline est supposée diriger la chaîne de sa leucine en position 5 dans la poche hydrophobe près de Leu300, essentielle pour la sélectivité pour DOPr contre

MOPr et KOPR, où ils sont remplacés par des résidus bien plus gros (respectivement tryptophane ou tyrosine). Jusqu'où peut-on augmenter le volume de cette chaîne latérale avant que cela ne devienne aussi délétère pour DOPr ? Quelle serait l'influence sur la sélectivité du peptide ? C'est afin de répondre à ces questions que Arnaud Proteau-Gagné et Dominique N'Dong se sont intéressés à la substitution de la Leucine par plusieurs acides aminés naturels ou non, de stéréochimie *L* ou *D* et de taille croissante (**Figure 42**).^{242,252} De plus, une telle information permettrait d'allonger cette chaîne et ainsi augmenter la lipophilicité. La synthèse des différents peptides, suivie de mesure de leur affinité et efficacité a permis d'établir une relation structure-affinité et d'établir un pharmacophore du cinquième résidu.

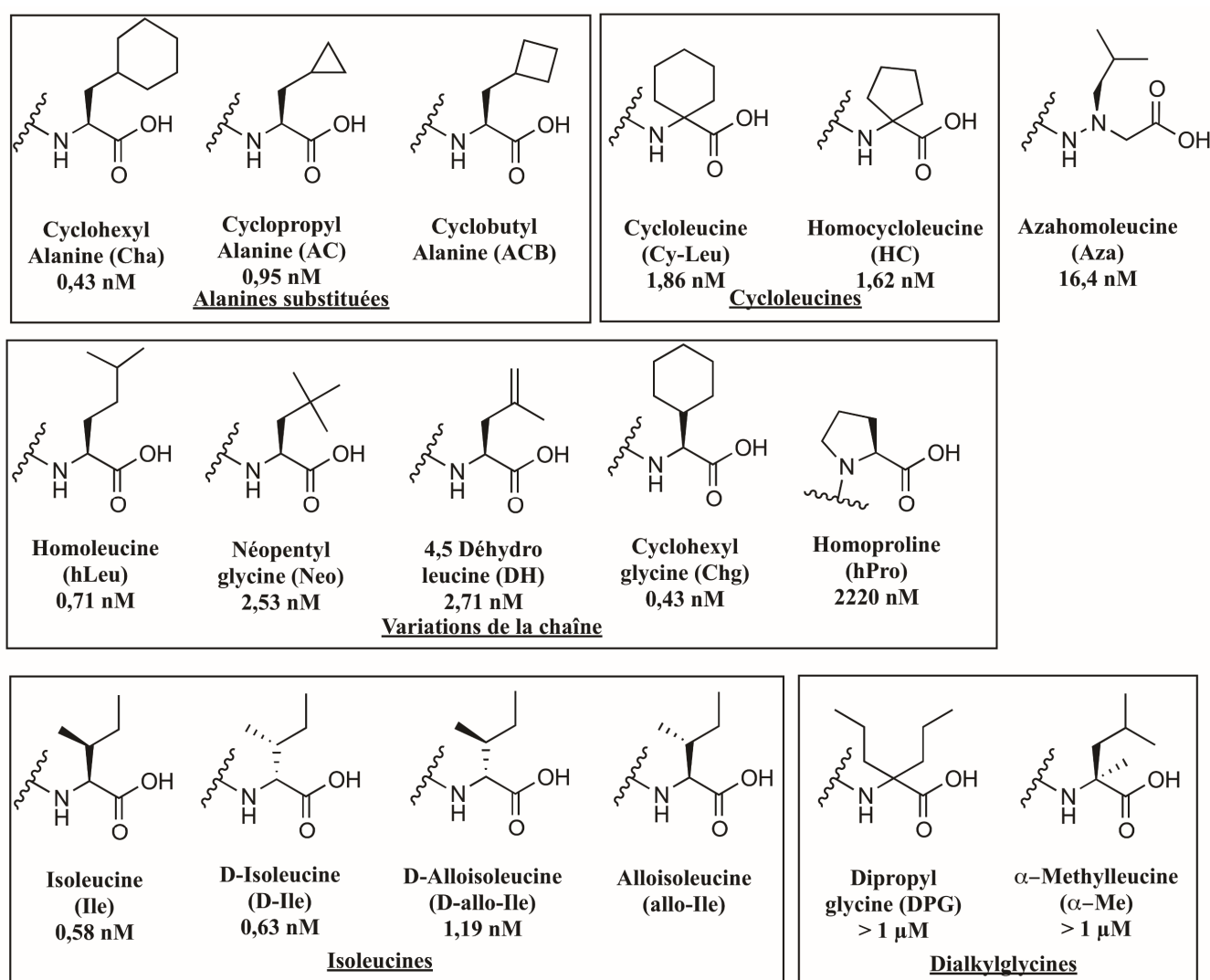


Figure 42. acides aminés utilisés en remplacement de la Leucine en position 5 de la Leu-enképhaline

Il ressort des résultats préliminaires que la famille des isoleucines est en générale tolérée par DOPr indépendamment de leur stéréochimie. La même observation peut être faite pour la catégorie « variations de chaînes », à l'exception de la cyclohexylglycine trop encombrante. L'ajout d'un carbone sur la cyclohexylalanine donne le même résultat. Les autres alanines substituées par un cyclopropyle donnent également de bons résultats (< 1 nM). En revanche, l'homoproline et l'homocycloleucine occupent un volume trop petit et ne sont donc pas capables d'établir des liaisons hydrophobes avec le récepteur. Les dialkylglycines quant à elles ont donné des résultats décevants (> 1 μ M), probablement dû à un fort encombrement stérique empêchant les peptides de s'accommoder correctement.

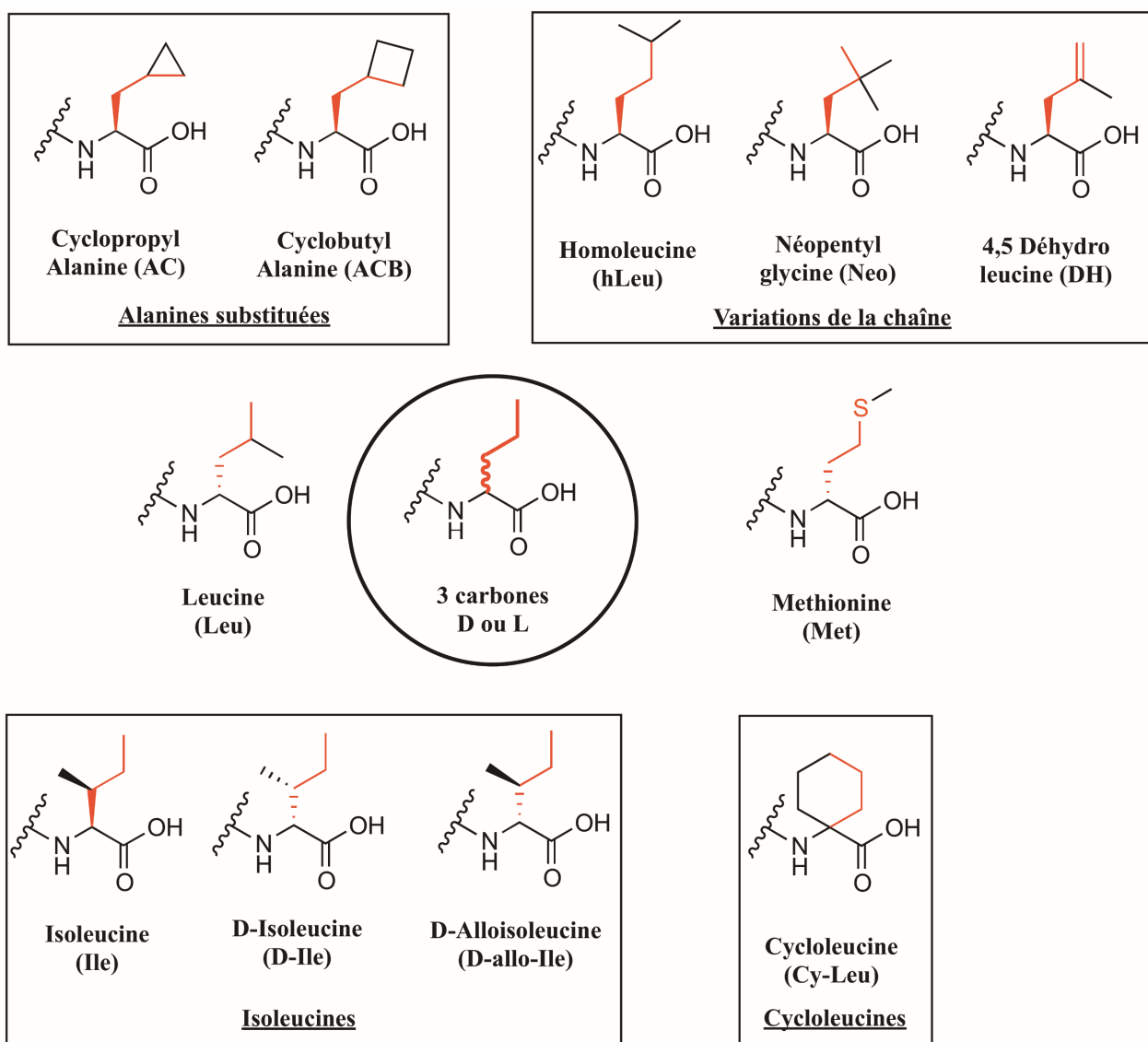


Figure 43. Pharmacophore du cinquième résidu de la Leu-enképhaline

Ces différentes observations ont alors permis de proposer un pharmacophore pour ce cinquième résidu (**Figure 43**), constitué d'une chaîne aliphatique de trois carbones et de stéréochimie indifférente (**Figure 43, centre**). On constate que tous les résidus compatibles présentent à peu près le même nombre de carbones que les enképhalines (4 carbones), la marge de manœuvre est donc plutôt mince, la nature ayant déjà trouvé la chaîne optimale. Ces résultats valident toutefois la nécessité de posséder une chaîne aliphatique en cette position avec la très forte probabilité d'interagir avec la poche hydrophobe autour de Leu300.

I.4.3. Nouvelles stratégies de macrocyclisation de la Leu-Enképhaline

Parallèlement à ce programme d'amide scan, de nouvelles stratégies de macrocyclisation de la leu-enképhaline ont été tentées, notamment par Guillaume Langlois lors de son projet de maîtrise, puis plus tard par Dominique Ndong. De façon similaire au DPDPE ou JOM-13, les peptides sont cyclisés par leurs positions 2 et 5, et ont pour but de remplacer le pont S-S, relativement fragile et sujet aux métabolisations. Dans notre cas, la cystéine ou la sérine sur laquelle un groupement allyle a été greffé, ont été intégrées en position 2 et 5. L'allyle en plus de jouer le rôle de groupe protecteur lors de la synthèse du peptide linéaire, sert d'amorce pour la cyclisation via métathèse de fermeture de cycle (RCM, *ring closing methathesis*), effectuée en phase solide. Cette méthodologie a l'avantage d'être relativement rapide et simple.

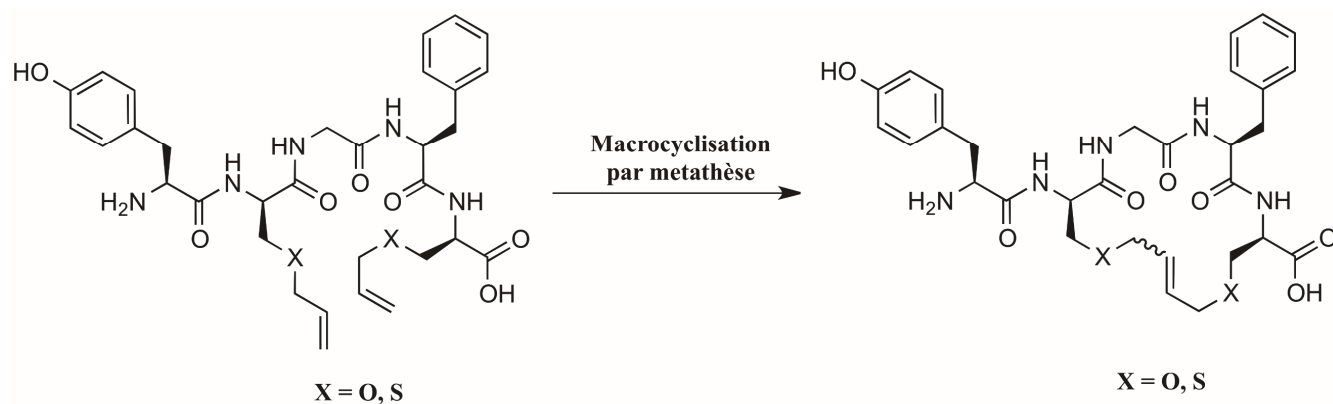


Schéma 2.

Ainsi, au moins douze analogues ont été synthétisés en comptant les analogues linéaires protégés par le groupement allyle et les analogues linéaires libres. Pour la plupart des peptides linéaires, la présence des groupements allyles donne des résultats acceptables pour DOPr (environ 1 nM), tandis que leur absence,

au contraire, réduit d'un ordre de grandeur leur affinité pour DOPr ($K_i > 10$ nM), soulignant ainsi l'incompatibilité d'un résidu polaire en position 5. Néanmoins, le peptide linéaire possédant deux cystéines va à contre-courant de cette conclusion avec un excellent score d'affinité pour DOPr (K_i 0,01 nM). Les raisons d'une telle affinité sont encore à l'étude, mais la formation d'une liaison covalente avec le récepteur est envisagée.

Les résultats biologiques des analogues cycliques démontrent une bonne tolérance de cette modification avec des affinités similaires voir améliorées comparée aux peptides natifs. En revanche, la sélectivité DOPr, n'est pas aussi grande que désirée (similaire à la Leu-enképhaline). Cela, concorde avec les conclusions tirées de la littérature, indiquant que l'élargissement du cycle joue en faveur de MOPr.²³⁶

Une autre approche a été tentée au cours du doctorat de Thi Than Hà Dao, consistant à lier la tyrosine en position 1 avec la phénylalanine en position 4 via un pont éthylène (3,8 Å) entre les deux cycles aromatiques (**Figure 44**).²⁵³ En effet le modèle de la conformation active proposé suite à l'amide scan suggère une distance assez proche (3,6 Å) entre les deux noyaux aromatiques. Ainsi en bloquant, cette conformation par un espaceur de taille adéquate, l'affinité de la molécule devrait se trouver améliorée.

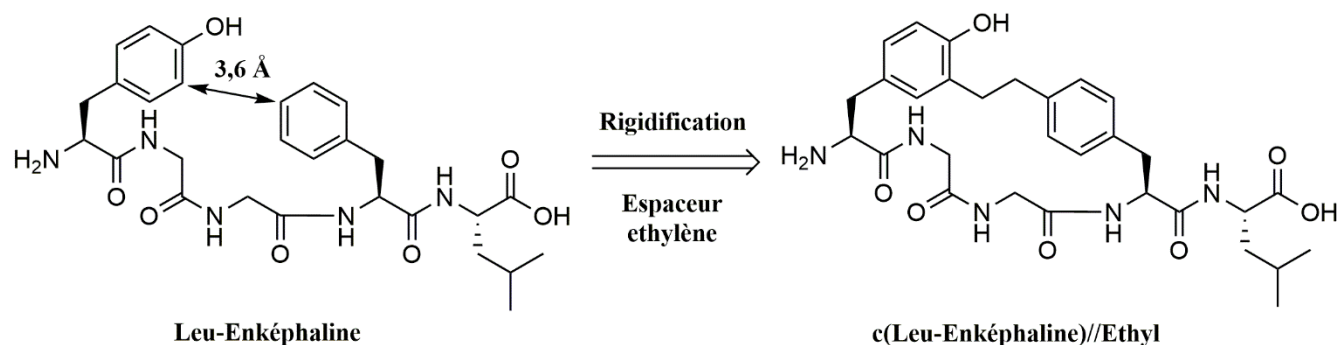


Figure 44. Rigidification de la forme active supposée de la Leu-enképhaline par un espaceur éthylène

Malgré une méthodologie de synthèse efficace, les premiers résultats biologiques obtenus montrent une faible affinité pour DOPr (3,6 μ M). Les raisons avancées pour ce résultat décevant seraient dû à une énergie trop éloignée de la conformation du macrocyclique docké dans notre modèle par rapport à sa forme la plus stable en solution. Ainsi le coût énergétique nécessaire pour se replier selon la conformation serait trop important, empêchant ainsi le ligand de se positionner correctement. Une autre hypothèse serait que la conformation modélisée ne se forme juste pas. Une récente publication de 2016 propose une

explication à ce phénomène.²⁵⁴ Les travaux menés par l'équipe de Kopysov sur la structure de plusieurs analogues de la Leu-enképhaline sur lesquels ils ont mesuré le transfert d'énergie par résonance en phase gazeuse, laissent entendre que la Leu-enképhaline favoriserait un éloignement des cycles aromatiques (10 Å). A l'inverse, la présence d'un acide aminé *D* en position 2 et 5, tel que dans le DADLE résulterait en une distance bien plus courte (6 Å). Une solution consisterait donc à introduire une *D*-Alanine en position 2 et une *D*-Leucine en position 5 sur la séquence de notre macrocycle. Une autre piste proposée par Ha Dao, serait d'introduire deux cystéines sur ces positions, avant de les attacher via un pont disulfure. Cette seconde rigidification permettrait ainsi de minimiser la barrière énergétique entre la conformation active et sa structure la plus stable.

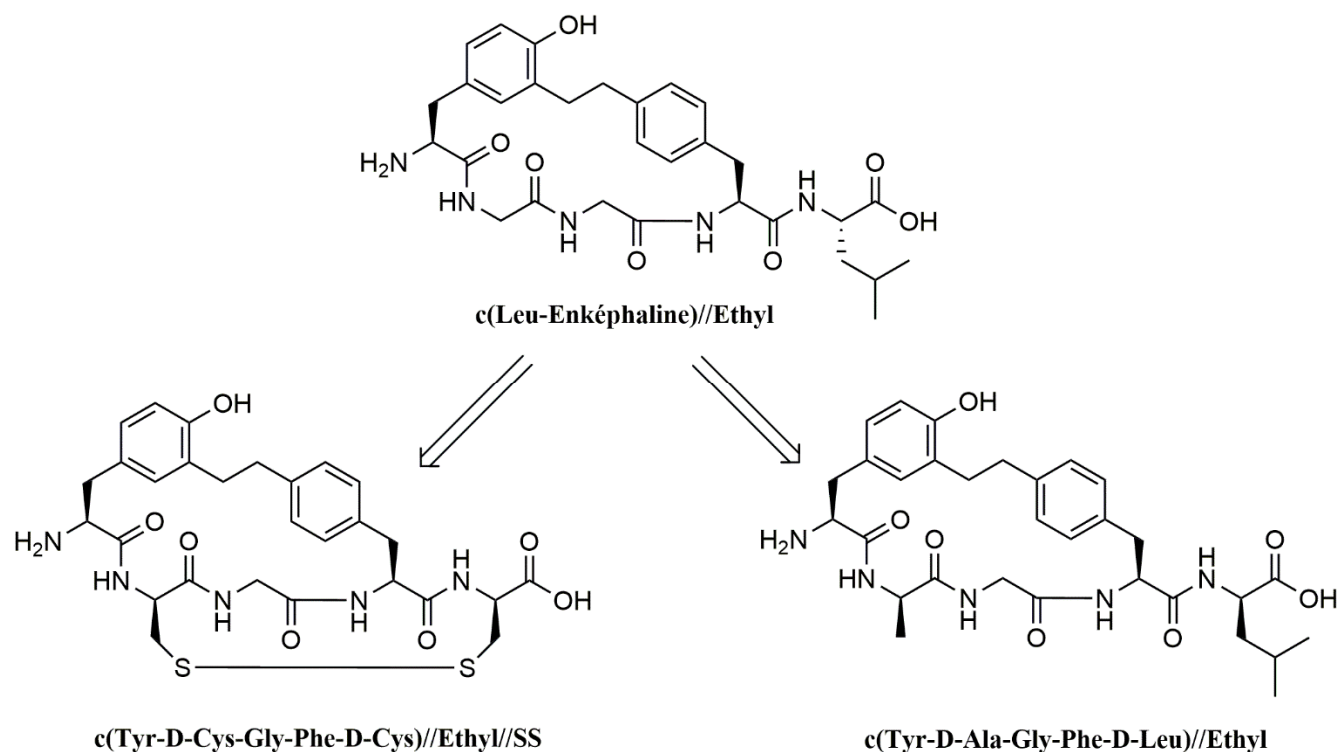


Figure 45. Perspectives envisageable pour la rigidification entre les deux noyaux aromatiques de la Leu-enképhaline.

I.4.4. Présentation du sujet.

Comme en témoigne la section précédente, les travaux du laboratoire ont déjà largement couvert plusieurs paramètres de la relation structure-activité de la Leu-enképhaline. La **figure 44** dépeint les différentes

positions étudiées par le laboratoire (en rouge), ainsi que celles proposées par certaines observations tirées de la littérature.

L'amide scan a permis d'établir l'influence de chacune des liaisons peptidiques pour la présentation active de celle-ci, tout en améliorant le profil pharmaceutique de ces molécules. Ces résultats nous ont en outre permis de proposer un premier modèle plausible de la Leu-enképhaline dans DOPr. La substitution systématique du cinquième résidu par plusieurs acides aminés de taille et de stéréochimie différentes a ensuite permis de dessiner un pharmacophore de cette position, tout en confirmant l'implication de sa chaîne latérale dans la même poche hydrophobe que le naltrindole.

Pour ce qui est des résultats tirés de la littérature, l'étude du noyau phénolique en position 1 suggère la nécessité de la présence d'un donneur de liaisons H. Aussi, l'ajout de deux méthyles en positions 2 et 5 de cette tyrosine résulte en une meilleure affinité. La position 2 a déjà également subi plusieurs substitutions. Elle est tolérante à plusieurs chaînes latérales ainsi qu'à l'insertion de stéréochimie D. Toutefois, la présence d'un résidu aromatique à l'image des endomorphines résulte en une meilleure affinité pour MOPr.

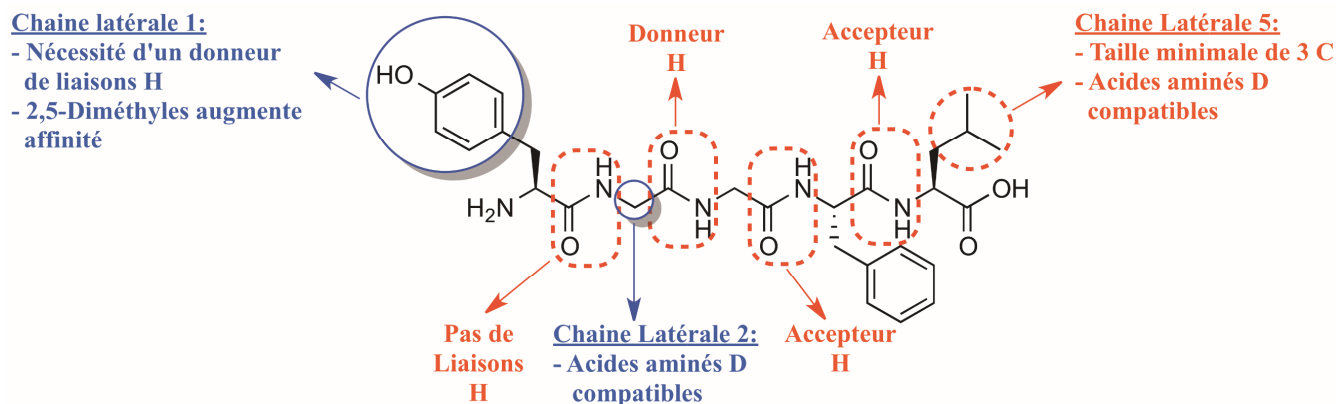


Figure 46. Modifications étudiées sur la Leu-Enképhaline par le laboratoire (en rouge), remportées dans la littérature (en bleu).

Bien que l'on sache qu'il soit primordial pour l'activité de conserver les charges en C-terminal et N-terminal, ces positions n'ont pas encore été complètement étudiées. Ces charges, essentielles pour la liaison des peptides opioïdes sont aussi malheureusement responsables en grande partie de leur faible lipophilicité. Ainsi le premier chapitre de cet ouvrage porte sur la mise en place de fonctions chimiques

à chaque extrémités, capables de conserver ces interactions clés tout en améliorant les propriétés pharmacocinétiques du peptide parent.

Quelques analogues de Leu-enképhaline ayant leur phénylalanine substituée ont d'ores et déjà été synthétisés par plusieurs groupes. Il manque toutefois une étude rationnelle sur cette position. Dans ce but, nous proposons dans le deuxième chapitre une approche plus systématique afin de tenter d'expliquer les paramètres régissant cette position.

Comme il l'a été mentionné à plusieurs reprises au cours de l'introduction, la macrocyclisation de la Leu-enképhaline a en général pour effets d'augmenter sa sélectivité pour un des récepteurs opioïdes, tout en augmentant sa stabilité et sa perméabilité dans la BHE. Cette stratégie a donc été appliquée au cours du chapitre 3 sur quelques analogues issus du chapitre 1. Par la même occasion, une nouvelle approche de cyclisation, utilisant la « click chemistry » sera présentée.

Notre équipe s'intéressant également à la compréhension des mécanismes de la douleur impliquant le récepteur DOPr, le chapitre 4 décrit le développement de dérivés de Leu-enképhaline radiomarqués au fluor 18. Pour ce faire, la bonne tolérance de la position 2 du peptide est exploitée afin d'insérer plusieurs chaînes aliphatiques préalablement marquées au fluor.

De quelle façon ces différentes modifications vont-elles influencer les propriétés pharmacodynamiques ou pharmacocinétiques des composés ? Agissent-ils de façon additive, soustractive ou synergique ? Peut-on combiner plusieurs modifications sur le squelette de la Leu-enképhaline ? C'est ce que nous allons nous attacher au cours des prochains chapitres.

Toutefois, avant de rentrer plus en détail, il convient de définir quelques points de méthodologie, afin de mieux comprendre le projet.

I.5. Méthodologie

1.5.1. Synthèse des composés de l'ouvrage

Dans le cadre de notre projet, la plupart des modifications suggérées dans les trois premiers chapitres ont nécessité le recours aux méthodologies de synthèse organique. Une fois les acides aminés modifiés obtenus, ils ont ensuite été protégés de façon adéquate avant d'être intégrés dans la séquence peptidique par synthèse peptidique sur phase solide (SPPS).²⁵⁵ Initié par l'invention de résine par Merrifield dans les années 1950, cette technique a vu son essor aux cours des 60 dernières années avec la diversification de résines et de méthodes de couplages efficaces, permettant une grande diversité chimique. Elle a l'avantage d'être relativement rapide et simple.

Dans un cas classique, le premier acide aminé est attaché sur la résine. S'ensuivent des étapes itératives de déprotection en *N*-terminal et de couplages avec les autres acides aminés portant des groupement protecteurs orthogonaux au besoin. Une fois la séquence désirée obtenue, celle-ci est clivée du support solide, dans des conditions dépendantes du type de résine utilisée. Cela étant fait, le peptide est ensuite purifié par Chromatographie en phase Liquide à Haute Performance (HPLC), avant de partir pour les tests biologiques. Une pureté d'au moins 96 %, est considérée comme satisfaisante pour réaliser nos tests biologiques.²⁵⁶

Concernant cet ouvrage, tous les peptides ont été synthétisés selon une stratégie Fmoc sur une résine 2-chlorotriptyle : chaque acide aminé utilisé est protégé par un groupement Fmoc sur son amine. Cette amine est ensuite déprotégée après chaque étape de couplage, avant de passer à l'étape suivante.²⁵⁷ Les chaînes latérales des peptides doivent donc être protégées par des groupes fonctionnels insensibles à ces conditions basiques. La résine quant à elle est clivée en condition acide (acide trifluoroacétique, TFA), en présence de « scavengers », afin d'éviter le rebranchement du peptide sur la résine, ou autres réactions secondaires. Dans la mesure du possible, les chaînes latérales ont été protégées par des groupes protecteurs sensibles aux acides, afin d'être déprotégées en même temps que le clivage. Pour les macrocycles présentés, ils ont été cyclisés soit en phase solide ou en solution après purification du peptide linéaire. Les analogues du chapitre 4 ont d'abord été synthétisés en condition « froide », c'est-à-dire avec un fluor non radioactif, afin de réaliser les divers tests biologiques. Ils sont ensuite synthétisés en

condition « chaude » (radioactives), avant d'être immédiatement testés sur les tissus. La méthodologie de cette section sera détaillée plus en profondeur dans le chapitre 4. Au cours de cet ouvrage, tous les composés ont été synthétisés par moi-même, à l'exception des ligands « froids » du chapitre 4.

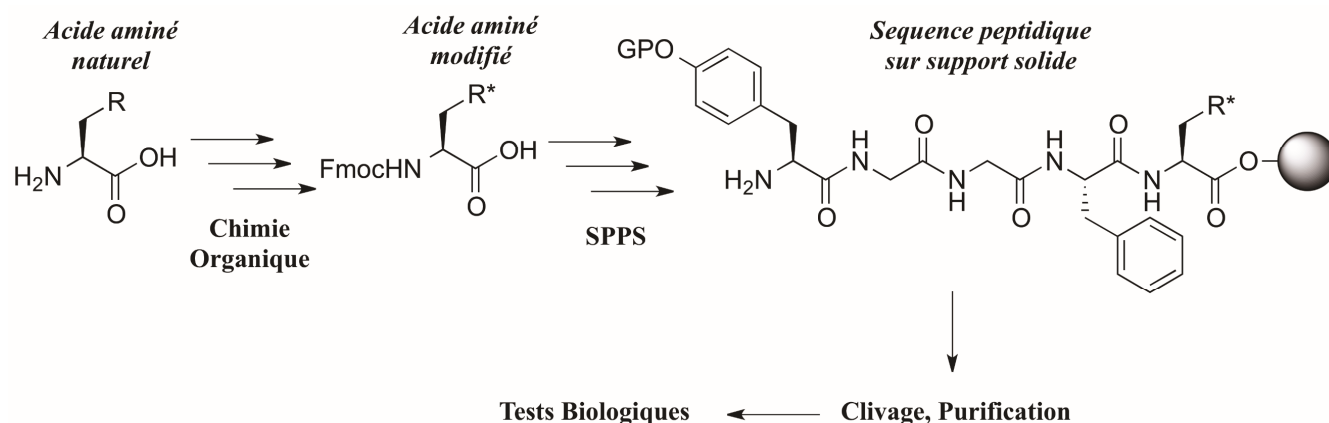


Schéma 3.

1.5.2. Affinité des ligands par radiocompétition

Une fois synthétisés, l'affinité des différents peptides est mesurée sur les récepteurs MOPr et DOPr. Pour cela des tests de radiocompétition sont effectués. Ils ont été réalisés en intégralité par Véronique Blais.

Pour ce faire, des ligands sélectifs à ces deux récepteurs (deltorphine II pour DOPr et DAMGO pour MOPr) sont radiomarqués, puis infusés dans une membrane contenant exclusivement le récepteur MOPr ou DOPr. L'isotope choisi pour ces tests est l'iode 131, au vu de sa meilleure radiospecificité comparé au tritium (H^3) utilisé auparavant. Ce choix permet entre autres une observation plus aisée et une récolte de données plus rapide. Une concentration croissante du ligand à tester est ensuite introduite dans la préparation. Le ligand testé va alors entrer en compétition avec la molécule radiomarquée, s'en suit une décroissance du signal radioactif mesuré par un compteur à radioactivité. Les différents points sont collectés et une régression est effectuée à l'aide du logiciel Graphpad. La concentration à laquelle 50 % du radiomarqueur est déplacé correspond à l' IC_{50} (**Figure 47**). Une fois normalisé avec l'activité spécifique du radioisotope par l'équation de Cheng-Prusoff, les constantes de liaison (K_i) sont obtenues et exprimées en nM.²⁵⁸ Plus la valeur de K_i est faible, meilleur est l'affinité du composé pour le récepteur.

Pour être considéré comme une bonne candidate, la molécule doit au moins se situer dans le même ordre de grandeur que la Leu-enképhaline, soit autour de quelques nM. Les essais sont réalisés en triplicata.

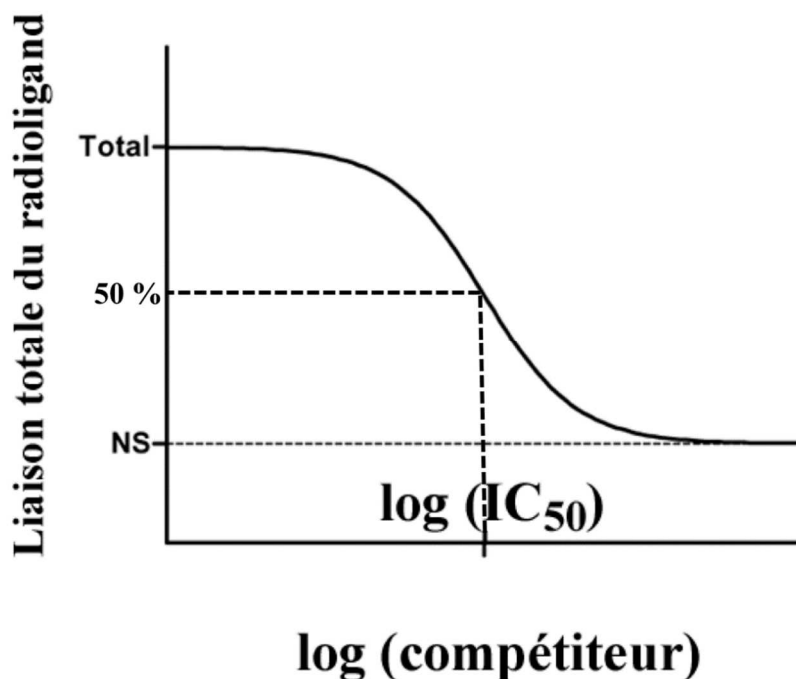


Figure 47. courbe de compétition entre un ligand et une molécule radiomarquée.

1.5.3. Mesure de l'efficacité biologique des composés par BRET

Avoir connaissance de l'affinité d'une molécule pour un récepteur n'est pas suffisant. Il convient en effet de déterminer si celle-ci produit une réponse biologique. Tout ces tests ont été réalisés par Véronique Blais et Brian Holleran. Plusieurs cas de figures peuvent survenir (**Figure 48**):

-La molécule est un agoniste. C'est-à-dire qu'elle produit une réponse biologique suite à sa liaison sur le récepteur. Un agoniste peut être partiel (i.e. réponse inférieure comparée au ligand natif) ou total (réponse similaire au ligand de référence).

-Un ligand peut être antagoniste. Sa liaison sur le récepteur ne produit aucune réponse biologique. Elle empêche la liaison des agonistes, en rentrant en compétition avec ceux-ci. Ces antagonistes trouvent leur

utilité lorsque l'on désire bloquer un processus biochimique, (ex : la naloxone dans le cas des opioïdes, qui permet de supprimer l'activité morphiniques dans les cas d'overdoses).

- À ne pas confondre avec les deux précédents points, une molécule peut aussi avoir une activité d'agoniste inverse. Par cela, on entend que la liaison du ligand produit un effet pharmacologique opposé à l'action constitutive du récepteur.

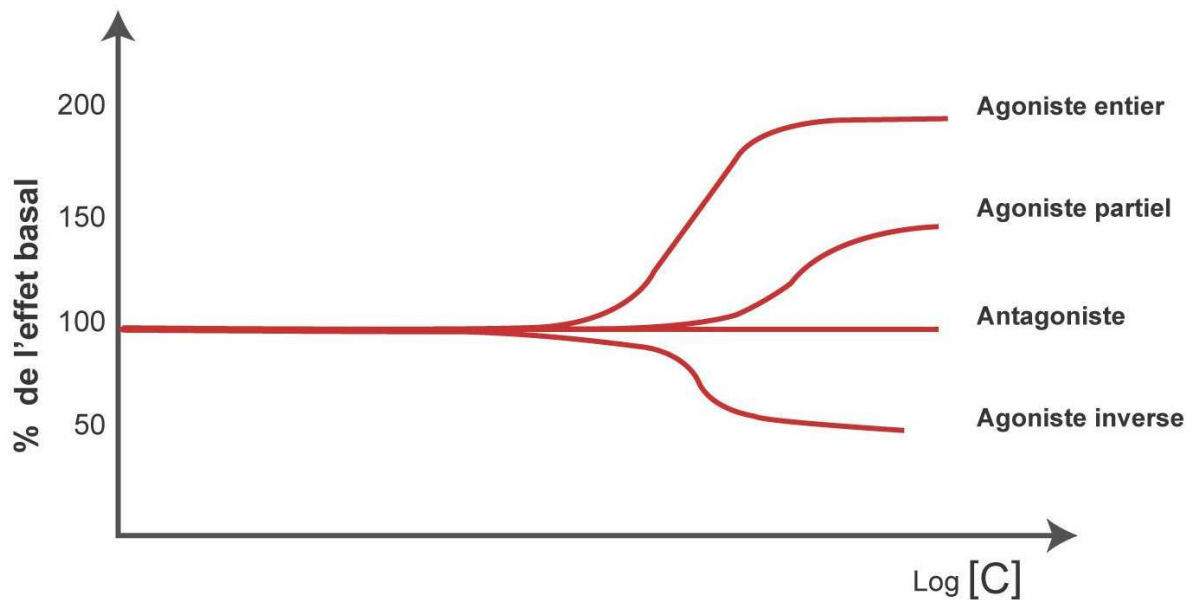


Figure 48. Effets biologiques possibles suite à la liaison d'un ligand sur son récepteur.

Afin de mesurer ces effets, nous nous sommes appuyés sur la technique de Bioluminescence par Résonance de Transfert d'Énergie (BRET).²⁵⁹ Comme l'indique son nom, cette technique repose sur le transfert d'énergie entre un accepteur (Green Fluorescent Protein, GFP) et un donneur (luciférase). Isolée, la luciférase catalyse la conversion de la coelenterazine A en coelenteramide en présence de dioxygène, créant ainsi sa couleur bleu caractéristique (480 nm). Cependant la proximité de GFP (< 10 nm) va induire un transfert d'énergie entre les deux entités en émettant cette fois une couleur verte (530 nm). Ce phénomène peut alors être mis à profit en les greffant sur deux protéines potentiellement impliquées entre elles lors de l'activation du récepteur (**Figure 49**). En cas de recrutement, la proximité de ce donneur et accepteur, va émettre la longueur d'onde caractéristique, mesurable à l'aide d'un fluoromètre. En infusant des concentrations croissantes du ligand à tester, il est alors possible de déterminer de la même façon que précédemment une courbe dose/réponse. La concentration à laquelle 50 % de l'effet biologique est produit s'appelle la dose efficace (EC_{50}). Dans le cas des RCPG, Bouvier a largement contribué au

domaine, en mettant aux point diverses technologies permettant de mesurer les processus biologiques impliqués dans ceux-ci.^{260,261,262} En branchant un accepteur sur une des protéines G et le donneur sur une autre protéine intracellulaire, il est possible de mesurer le recrutement des différentes protéines.

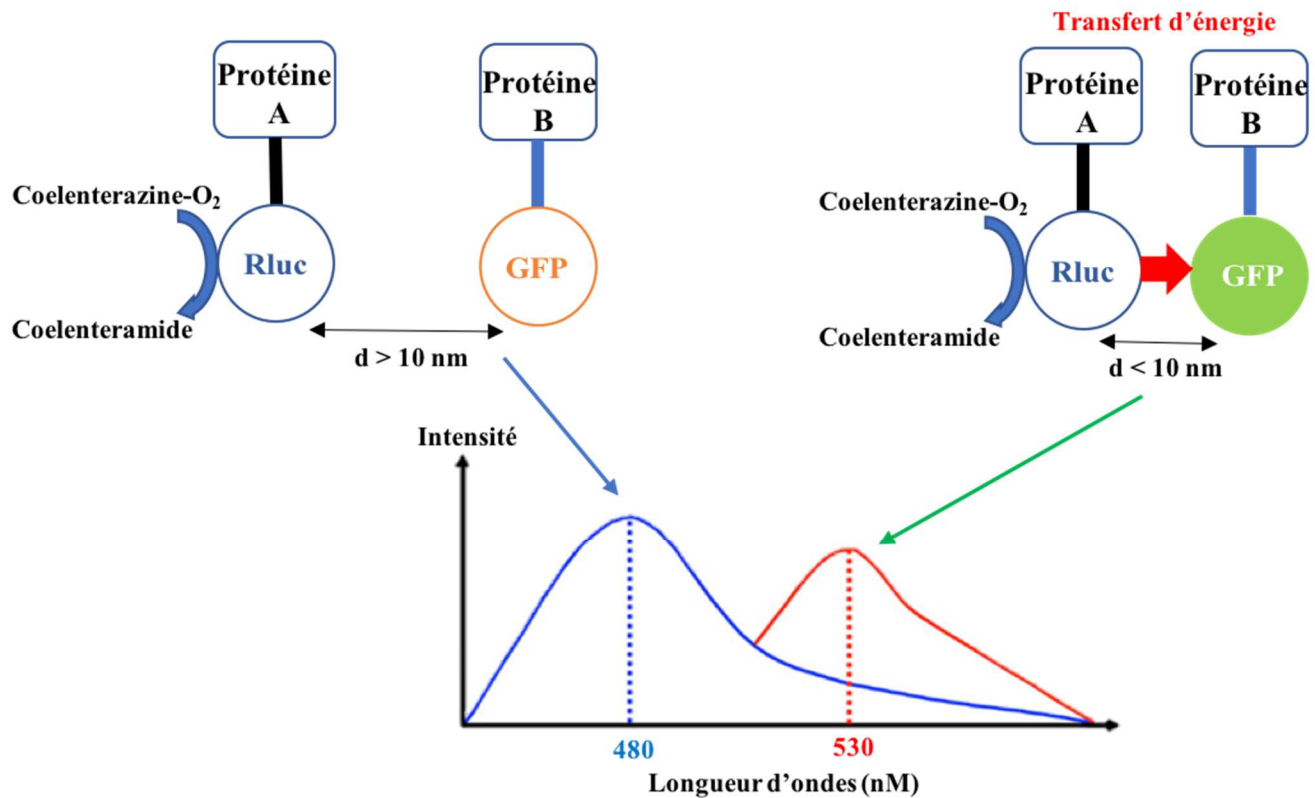


Figure 49. Principe de la technique de Bioluminescence par Résonance de Transfert d'Énergie (BRET)

Nous nous sommes particulièrement intéressés au processus EPAC et au recrutement de la β -arrestine.^{263,264} Pour le premier cas (**Figure 50**), la GFP et la Rluc ont été greffées sur la protéine EPAC. En amont de la mesure, de la forskoline est introduite afin d'augmenter le niveau d'AMP cyclique qui vient alors s'intercaler entre le donneur et l'accepteur.²⁶⁵ L'activation du récepteur par le ligand enclenche le recrutement de Gi, qui va alors inhiber l'adénylate cyclase et donc la production de cAMP. Rluc et GFP se retrouvent à nouveau proches, ce qui produit un changement de longueur d'onde. La décroissance du signal peut alors être mesurée de façon dépendante de la concentration.

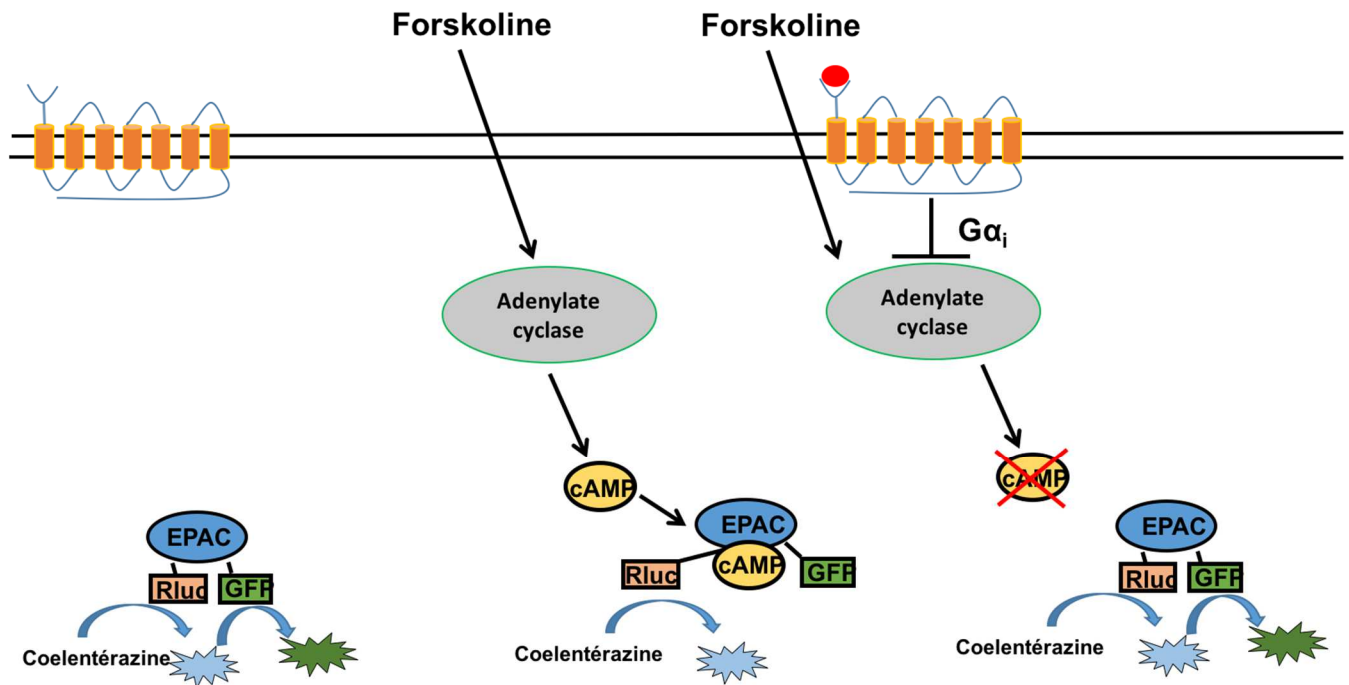


Figure 50. Mesure par BRET du recrutement de Gi consécutif à l'activation du récepteur.

Pour ce qui est de la β -arrestine (**Figure 51**), la GFP est branchée en position C-terminale du récepteur, tandis que la luciférase est greffée sur la β -arrestine. Le recrutement de cette dernière va alors produire une intensification du signal dépendante du gradient, due à la proximité de l'accepteur et du donneur.

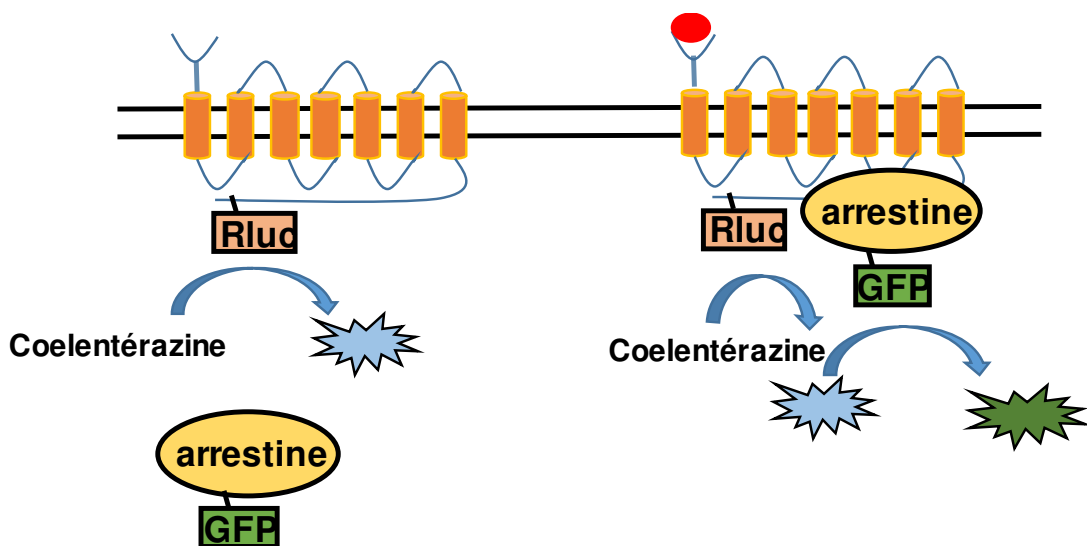


Figure 51. Mesure par BRET du recrutement de la β -arrestine suite à l'activation du récepteur.

1.5.4. Pharmacocinétique

Avoir en main une molécule à la fois affine pour DOPr et activant EPAC, tout en limitant le processus de la β -arrestine est très encourageant. Toutefois, cela ne saurait être suffisant pour envisager son utilisation, si sa perméabilité à travers la BHE ou sa stabilité sont faibles. Il convient donc de mesurer ces paramètres.

Une technique simple et rapide à réaliser pour modéliser la perméabilité passive (sans l'aide de transporteurs) est le logP ou logD_{7,14} (s'il est fait à pH physiologique). Il consiste au logarithme du rapport ($C_{\text{octanol}}/C_{\text{PBS}}$), c'est-à-dire le rapport entre la concentration du composé dans l'octanol (qui modélise la partie lipophile de la membrane) sur la concentration dans l'eau (partie hydrophile de la membrane). L'eau est ici remplacée par du PBS qui est une solution aqueuse tampon à pH 7,14. La molécule à mesurer est agitée un certain temps dans un mélange octanol/PBS, puis chacune des phases est séparée par décantation, avant de mesurer la concentration du ligand (par HPLC dans notre cas). Ces mesures sont réalisées en triplicata.

Pour pouvoir passer la BHE, il est généralement admis que le principe actif doit posséder un logD situé entre 2 et 4. En dessous, la molécule est trop polaire pour pouvoir espérer franchir la barrière. Au contraire une valeur supérieure, traduirait un caractère lipophile et se retrouverait alors piégée dans les tissus gras de l'organisme. Bien que très populaire chez les chimistes médicaux, cette technique est aujourd'hui sujet à caution, du fait qu'elle ne traduit pas toutes les composantes de la perméabilité de la BHE. Elle constitue cependant un indice rapide, simple à obtenir et peu onéreux. Les valeurs de tPSA calculées et le temps de rétention en HPLC des différents composés, souvent utilisés comme indice de perméabilité et seront également présentés dans cette thèse. Des tests de perméabilité parallèles sur des membranes artificielles (PAMPA), prenant cette fois en compte tous les aspects de la perméabilité passive, auraient pu être envisagés. N'ayant pas encore l'expertise nécessaire pour cela, cela n'a pas été le cas. Ils pourraient toutefois être effectués pour les têtes de séries dans un futur proche.

Concernant la stabilité plasmatique, les différents principes actifs sont infusés à concentration fixe dans du plasma de rat à 37 °C. La réaction biochimique est ensuite arrêtée à intervalle régulier avec une solution de méthanol contenant une concentration fixe d'étalon interne (Fmoc-Leucine). Après filtration des

protéines, les solutions sont ensuite analysées par Chromatographie Liquide à Ultra Performance/Spectrométrie de Masse (UPLC/MS), afin de mesurer la concentration relative du peptide par rapport à l'étalon interne. Après régression des données dans Graphpad, il est alors possible d'obtenir le temps de demi vie ($T_{1/2}$), qui correspond au temps auquel 50 % du peptide est encore présent. La partie spectroscopie de masse permet de déterminer les fragments issus de la dégradation par les protéases. Tous ces tests ont été réalisés par moi.

1.5.5 Modélisation

Une fois les résultats d'affinités obtenus, une vague de calculs est réalisée afin d'obtenir une explication rationnelle des résultats obtenus. Bien que très pratique, cette technique est relativement simple et aucun ne saurait tirer des conclusions définitives. Ces modélisations et leur analyses ont été effectuées par moi.

Comme mentionné précédemment, grâce au projet d'amide scan, le professeur Yves Dory, a été capable de mettre au point un modèle de la leu-enképhaline dans DOPr. Pour cela, il a pris la structure cristallographique 4N6H sur la base de données de la *Protein Data Bank* (PDB). Il a ensuite docké successivement des molécules de taille croissante, afin d'accommoder progressivement la cavité du récepteur à l'aide du logiciel Schrödinger. Aidé par les résultats de l'amide scan, il a pu déterminer de quelle façon les amides étaient impliqués dans le repliement de la Leu-enképhaline. En s'inspirant de structures cristallographiques disponibles de la Leu-enképhaline, il a proposé une structure active probable, puis l'a amarrée dans le récepteur. Il a établi que pour avoir des résultats probants, il était nécessaire de laisser un degré de liberté de 15 Å dans la cavité lors du docking induit. Il a ensuite validé son hypothèse en dockant d'autres ligands connus de DOPr. En introduisant le Naltrindole dans ce nouveau récepteur et en suivant la même règle, il a pu observer que le récepteur était similaire à la structure de DOPr (4N6H).¹²²

En partant du modèle créé par le Pr Dory, les modifications sont apportées directement sur celle de la Leu-Enképhaline. La structure du ligand est alors minimisée (champs de force OPLS) à l'intérieur du récepteur avant de faire le docking à l'aide du logiciel *Molecular Operating Environment* (MOE).²⁶⁶ Ce docking est fait en laissant de la liberté au ligand ainsi qu'aux chaînes latérales des résidus du récepteur dans un rayon de 15 Å. Les cinq meilleures poses sont ensuite inspectées une à une afin de s'assurer de la présence des interactions essentielles de la partie message.

CHAPITRE 1 : MODIFICATIONS ISOSTÉRIQUES EN POSITION C-TERMINALE ET N-TERMINALE DE LA LEU-ENKÉPHALINE.

1.1. Introduction

La Leu-enképhaline malgré son innocuité et sa relative sélectivité pour DOPr ne peut être utilisée pour le traitement de la douleur en raison de sa rapide dégradation et de sa faible perméabilité dans le cerveau. Afin de parer à ces inconvénients, plusieurs modifications ont déjà été réalisées sur les chaînes latérales,^{211,224,225} et les liaisons amides de ce peptide.^{216,244-246} Outre une sélectivité pour DOPr parfois améliorée, il en est ressorti une meilleure stabilité ainsi qu'une modeste augmentation de la lipophilicité. Parmi ces modifications, l'insertion d'un acide aminé D en position 2, semble être décisive pour la stabilité; probablement par sa position critique au niveau du site de clivage des enképhalinases.²⁶⁷

La faible augmentation de la perméabilité dans la BHE pourrait être expliquée par le fait qu'aucune des modifications généralement proposées dans la littérature ne concerne les extrémités en C-terminale et N-terminale de la molécule, toutes deux chargées (respectivement -1 et +1). Or, ces deux charges ioniques contribuent grandement à la faible valeur de $\log D_{7.4}$ (< -1).²⁶⁸ La modification de ces positions est d'autant plus critique qu'elles sont essentielles pour l'activité (interaction de l'ammonium avec Asp194) ou la sélectivité (le carboxylate formerait un pont salin avec Arg291 et un pont H avec Trp284). Chaque mutation doit donc être pensée prudemment, au risque de changer le profil d'affinité ou d'activité des candidats. Ainsi le remplacement des fonctions carboxylate et ammonium par des isostères plus lipophiles capables de conserver les interactions clés avec le récepteur permettrait d'augmenter la perméabilité tout en conservant leur affinité pour DOPr. Aussi étant proches des sites de clivages, leurs modifications pourraient également produire une plus grande stabilité plasmatique.

I.1.1. Les isostères d'acide carboxylique dans la littérature.

Plusieurs paramètres tels que le volume, la forme, la distribution électronique ou la lipophilicité doivent être pris en compte lorsque l'on considère le remplacement d'une fonction chimique par un bioisostère. Bien que ces grandeurs soient facilement prévisibles par calcul, l'effet de tels remplacements sur l'affinité

ou l'activité biologique est plus difficile à rationaliser. Les isostères possibles d'acides carboxyliques peuvent être catégorisés en isostères acyliques ou cycliques. Quelques exemples jugés pertinents sont présentés à la **Figure 52**.

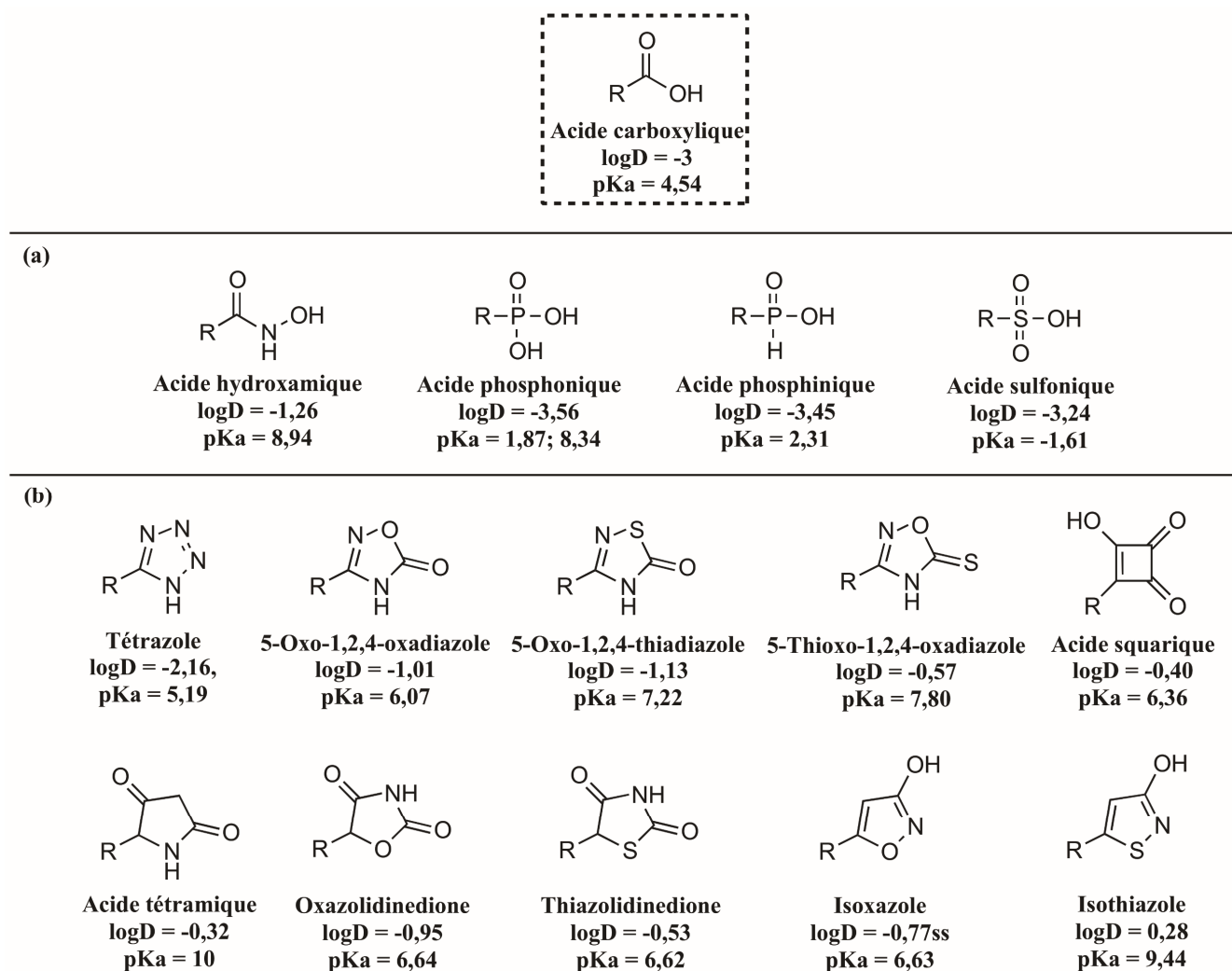


Figure 52. Exemples d'isostères d'acides carboxyliques (a) acyliques ou (b) cycliques. Les valeurs de pKa et de logD ont été calculées à partir des outils de la suite logicielle ChemAxon, en prenant R = CH₃.

À l'inverse des fonctions cycliques (**Figure 52b**) rigides et plus limitées dans leurs possibilités d'interactions avec le récepteur, les différents analogues linéaires présentés (**Figure 52a**) ont l'avantage d'être flexibles et de pouvoir éventuellement s'adapter plus facilement aux résidus du récepteur. Bien

qu'offrant un gain conséquent d'hydrophobicité, les pKa élevés de l'acide hydroxamique et du sulfonamide, ne présagent pas la présence de charge négative à pH physiologique. À l'inverse, les pKa des acides phosphoriques, phosphiniques ou sulfoniques sont tous situés dans une gamme de pKa satisfaisants à nos critères, mais ont des valeurs de logD trop peu élevées.

Les isostères cycliques quant à eux, ont une taille plus proche de l'acide et sont bien plus rigides. Cette caractéristique peut toutefois être bénéfique si l'analogue choisi est capable de parfaitement s'accommoder au schéma d'interactions avec le récepteur. Bien que l'isoxazole, le 5-oxo-1,2,4-oxadiazole, l'acide squarique ou l'oxazolidinedione soient des bioisostères envisageables, le tétrazole, du fait de son encombrement moindre, a été considérée dans un premier temps pour le remplacement du carboxylate.

Les tétrazoles sont parmi les isostères de carboxylate les plus couramment utilisés en chimie médicinale.²⁶⁹ Ils existent à l'équilibre entre deux protomères 1*H* et 2*H* (**Figure 53**). Bien que connus pour leurs capacités à former des ponts disalins avec les amidines et guanidines, la délocalisation de la charge négative pourrait laisser présager une affinité légèrement diminuée par rapport à celle du carboxylate.^{270,271}

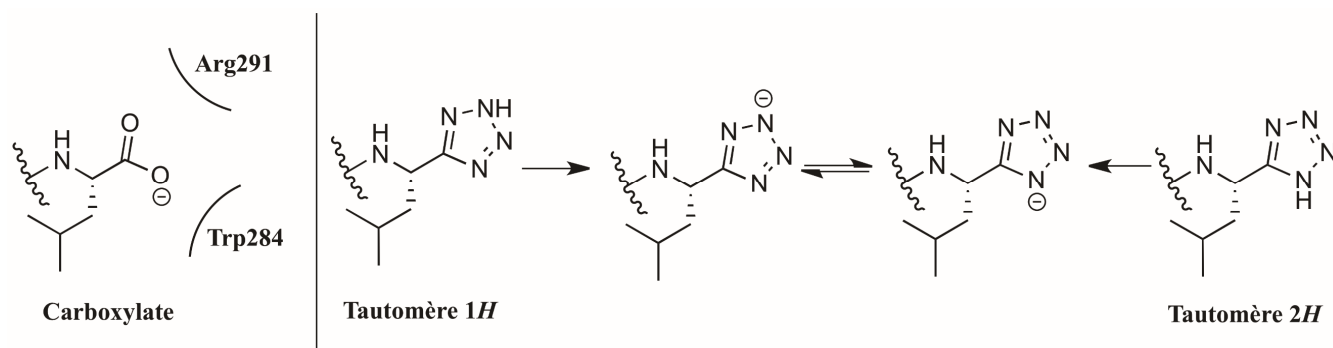
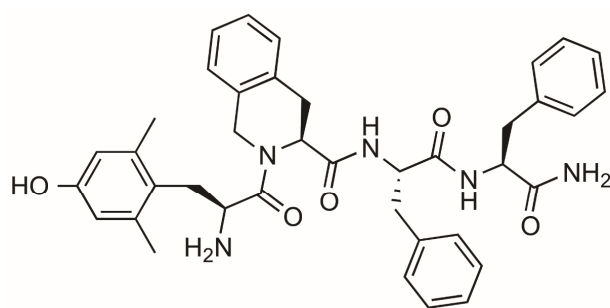


Figure 53. Les deux tautomères du tétrazole à l'équilibre et leurs possibles liaisons avec le récepteur DOPr.

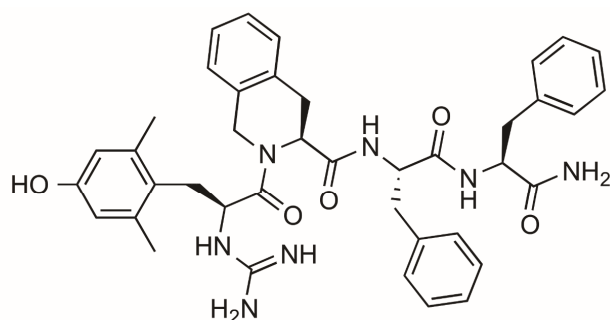
Le remplacement du carboxylate de la Leu-enképhaline par un tétrazole a déjà été investigué par Manturevicz et al. en 2007, toutefois aucun résultat concernant les propriétés pharmacocinétiques de ce composé n'a été communiqué à ce jour, et ce malgré des résultats d'affinité proche de celle de la Leu-enképhaline.²⁷²

I.1.2. Modifications en position *N*-terminale rapportées dans la littérature.

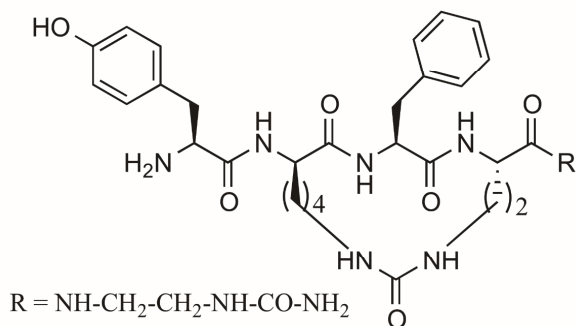
Concernant la partie *N*-terminale, peu d'isostères d'ammonium sont décrits dans la littérature. Les stratégies autour de cette fonction reposent essentiellement sur l'acétylation de celle-ci. Une telle opération est inapplicable dans le cas de la Leu-enképhaline, où une forte baisse de l'activité est observée.²⁷³ De même, la dialkylation de l'ammonium résulte la plupart du temps par une activité antagoniste. Ainsi, la conversion d'une amine par un groupement respectant à la fois le mode d'interaction et peu encombrant n'est pas aisé.



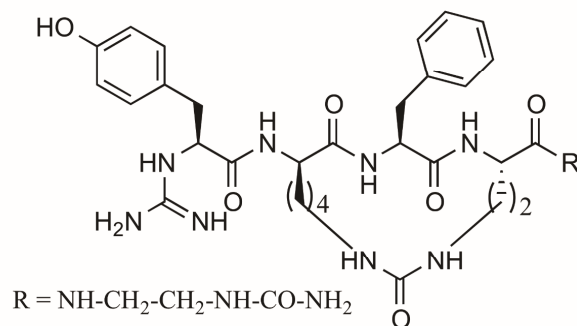
H₂N-Dmt-Tic-Phe-Phe-NH₂
MOPr agoniste/DOPr antagoniste



Gua-Dmt-Tic-Phe-Phe-NH₂
MOPr agoniste/DOPr agoniste



H₂N-Tyr-D-Lys-Phe-Dab-R
K_i DOPr = 9,1 nM



Gua-Tyr-D-Lys-Phe-Dab-R
K_i DOPr = 2.85 nM

Figure 54. Structures chimiques de peptides opioïdes possédant une amine quaternaire (gauche) et de leur analogues ayant subi une guanidylation en position *N*-terminal (droite)

Il a cependant été démontré que le remplacement de l'amine terminale par un guanidyle sur des analogues d'endomorphines permettait d'augmenter leur propriété cationique (en augmentant leur pKa), favorisant ainsi la liaison de ces molécules sur les capillaires de la BHE, et par la suite l'entrée de ces ligands dans le cerveau par endocytose.^{274,275} C'est dans cette optique que l'équipe du Pr Schiller a effectué une stratégie similaire sur des peptides MOPr agonistes/DOPr antagonistes (**Figure 54**).²⁷⁶ Outre des valeurs d'affinité similaires aux peptides parents, il a surtout été constaté la conversion de l'activité de ces molécules en agoniste partiel ou total pour DOPr. L'effet d'une telle opération sur les propriétés pharmacocinétiques n'a malheureusement pas été détaillée. Peu de temps après, une autre équipe a réalisé une approche identique sur des analogues cycliques de la deltorphine, mixtes MOPr/DOPr, où des observations similaires ont pu être faites, ainsi qu'une stabilité protéolytique augmentée.²⁷⁷ À notre connaissance, cette manœuvre n'as pas encore été appliquée à des agonistes sélectifs DOPr.

I.1.3 Proposition

À la lumière des informations apportées dans les deux précédentes sections, le tétrazole apparaît comme un bon candidat pour le remplacement isostérique de l'acide carboxylique, tandis que le guanidyl pourrait avantageusement se substituer à l'ammonium terminale. Ces modifications devraient pouvoir améliorer le profil pharmacocinétique de la Leu-enképhaline tout en conservant les interactions moléculaires clés avec DOPr.

Nous proposons donc dans un premier temps de synthétiser des analogues de Leu-enképhaline (LE, **1**) portant une leucine (LET, **2**) ou une D-leucine-tétrazole (DLET, **3**) en position 5, puis dans un deuxième temps l'ajout d'un guanidyle (GuaLE, **4**) en position 1. Les deux mutations seront ensuite combinées (GuaLET, **5**). De plus, il serait également intéressant d'étudier l'effet du tétrazole sur la *D*-Ala²-Leu⁵-enképhaline (DALET, **6**) et la *D*-Ala²-*D*-Leu⁵-enképhaline (DADLET, **7**) pour lesquelles la présence d'un acide aminé en position 2 confère déjà une stabilité accrue. Finalement, l'éventuelle synergie des trois modifications sera analysée sur le composé comportant les trois variations (GuaDALET, **8**).

Après leur synthèse, l'affinité ainsi que leur efficacité biologique pour DOPr et MOPr de chacun de ces analogues seront déterminés, avant que soient mesurés leur logD. Le bénéfice de chacune des modifications apportées sur la stabilité sera également examiné.

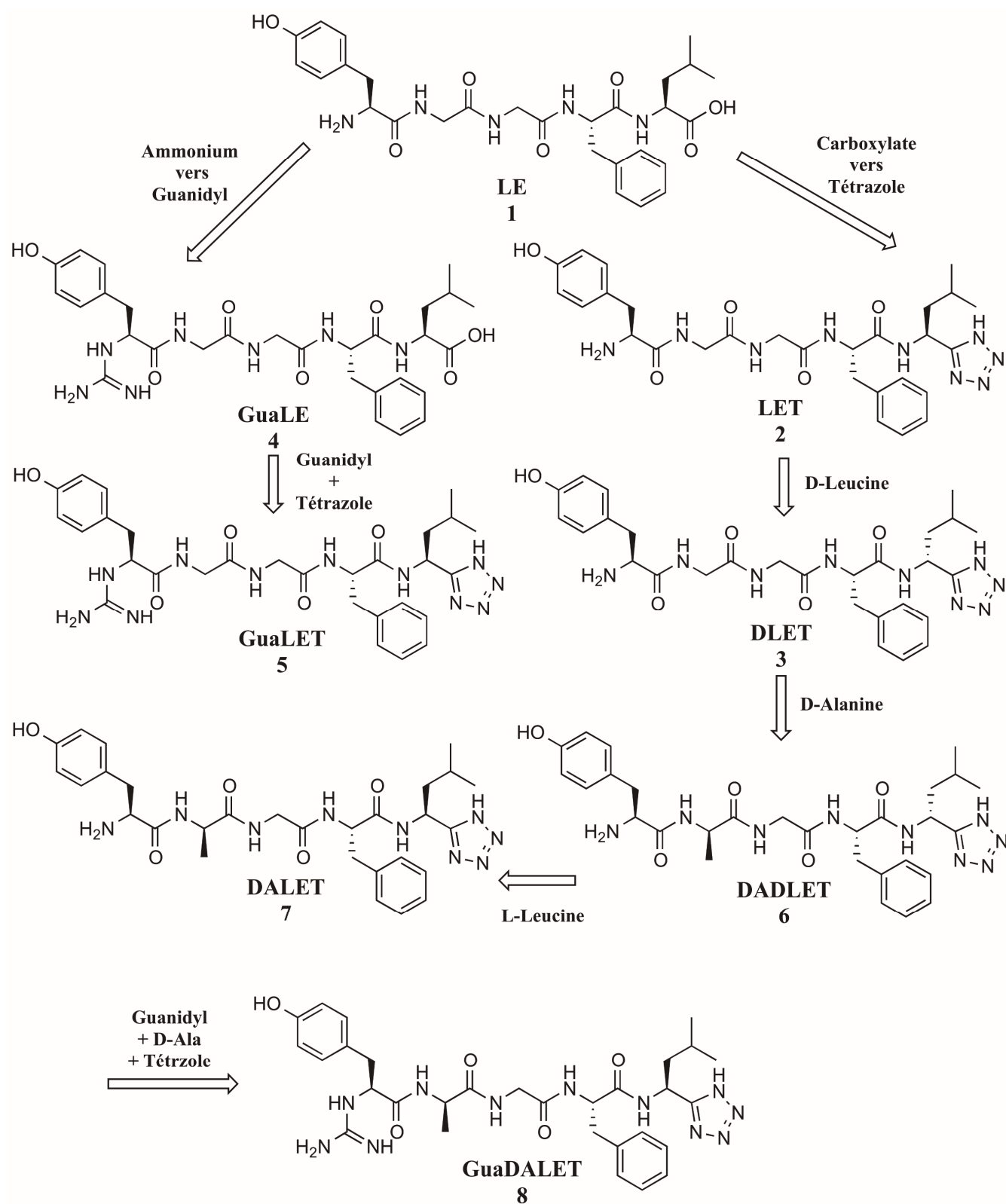


Figure 55. Structures chimiques des composés cibles portant une, deux ou trois altérations en position 1, 2 ou 5 de la Leu-enképhaline.

1.2. Synthèse

1.2.1. Synthèse des Leucines-tétrazole

Dans un premier temps, les leucines modifiées ont été préparées selon les procédures décrites dans la littérature (**Schéma 4**).²⁷⁸ Pour ce faire, la Fmoc-leucine commerciale a d'abord été convertie en amide en présence d'anhydride Boc et de carbonate d'ammonium, avant d'être déhydraté en nitrile par le traitement avec de l'anhydride trifluoroacétique. Le nitrile a ensuite été converti en tétrazole par une cycloaddition de Huisgen. Bien que les deux premières étapes se soient déroulées sans problèmes, la formation du noyau tétrazole a été plus problématique avec des rendements plus limités et des temps de réactions bien plus longs que ceux rapportés dans la littérature (jusqu'à 4 jours). Suspectant la mauvaise solubilité du composé **11** d'être responsable de ce phénomène, nous avons été heureux d'observer que l'addition de DMF jusqu'à la solubilisation totale de la mixture, permettait d'augmenter grandement l'avancement de la réaction, tout en ramenant le temps de reflux à seulement 16 h (**Tableau 6**).

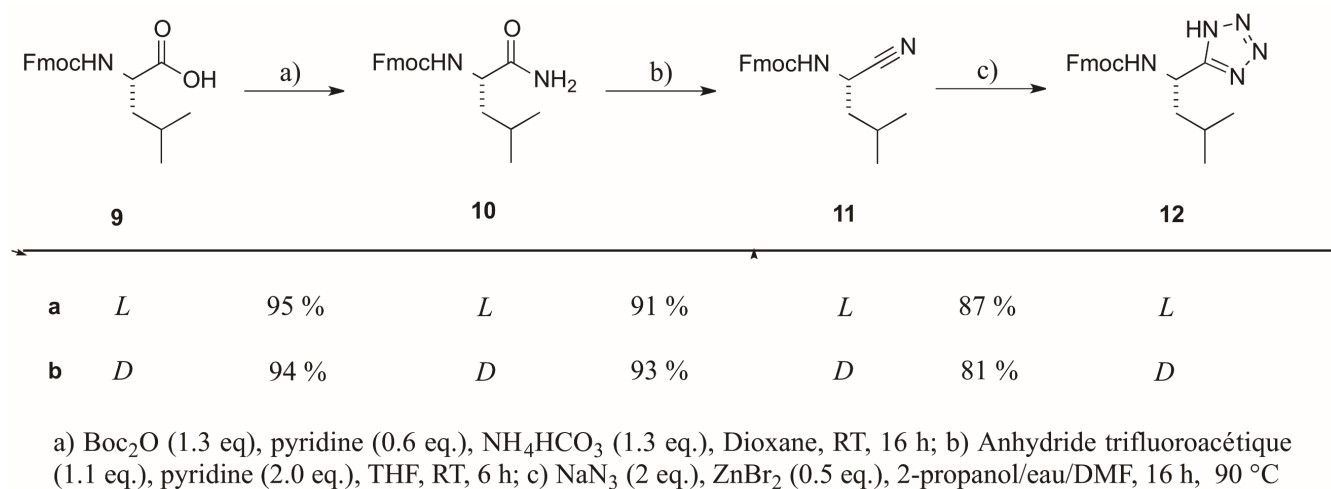


Schéma 4.

Tableau 6. Conditions de réactions pour la formation du tétrazole.

Système de solvants	Temps de réaction	Rendements
Isopropanol/Eau	4 jours	33-45 %
Isopropanol/Eau/DMF	16 h	81-87 %

1.2.2. Synthèse peptidique sur phase solide et modification en *N*-terminale

Une fois les leucines-tétrazole des deux séries énantiomériques synthétisées, celles-ci ont été attachées sur la résine 2-chlorotrityle avec un taux de chargement supérieur à 80 %. Les différents analogues peptidiques ont ensuite été synthétisés de façon classique sur phase solide, via une stratégie Fmoc (Schéma 5).

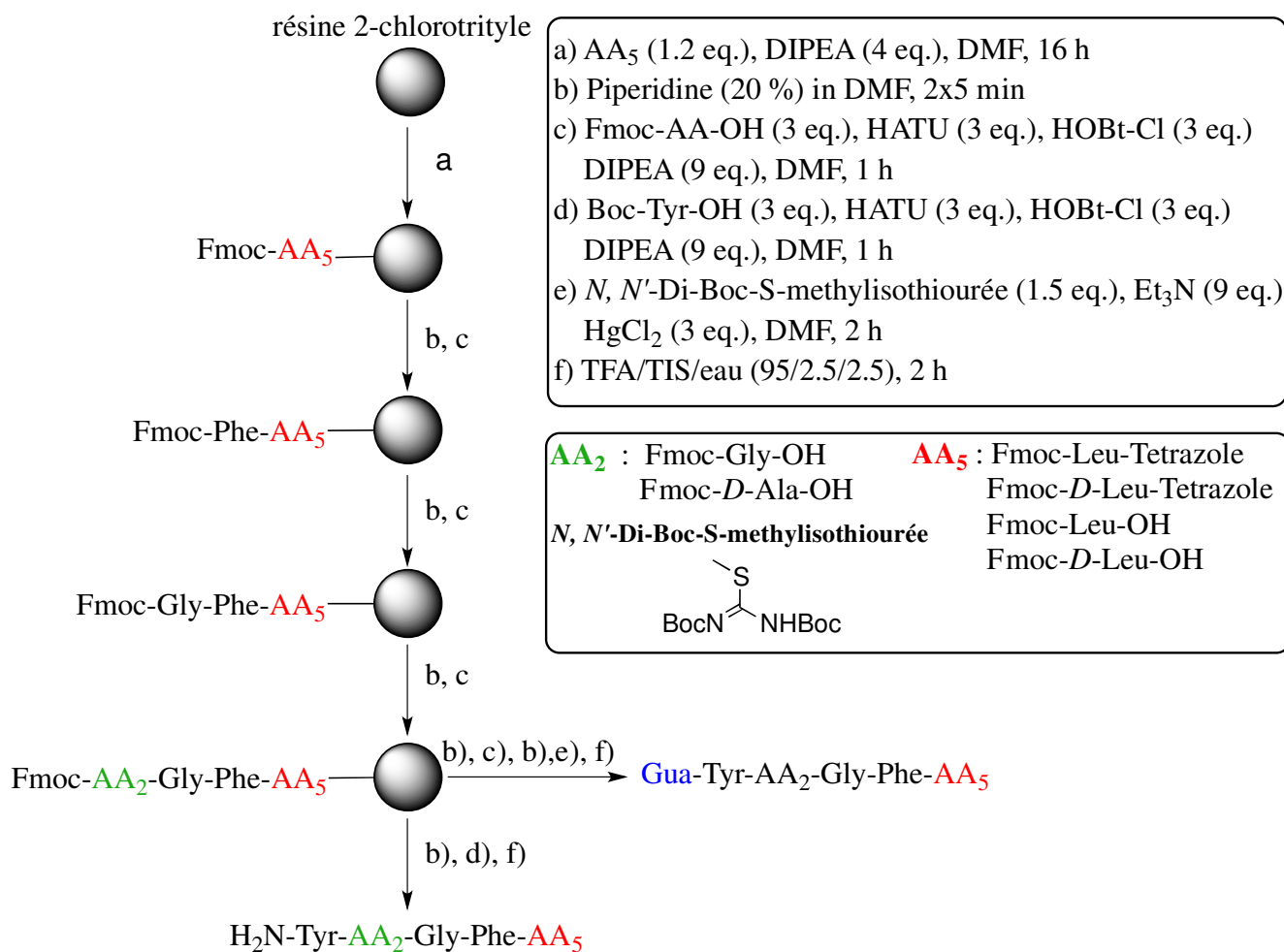


Schéma 5.

Pour ce qui est de l'insertion de la fonction guanidyle en position *N*-terminale, plusieurs solutions s'offraient à nous. La plupart des procédures recensées dans la littérature s'effectuent en solution et nécessitent donc le clivage du substrat de la résine. De ce fait, il est indispensable d'introduire une

protection orthogonale en C-terminal et plusieurs étapes sont nécessaires à la conversion de l'amine en guanidyle, complexifiant ainsi grandement la synthèse.²⁷⁷

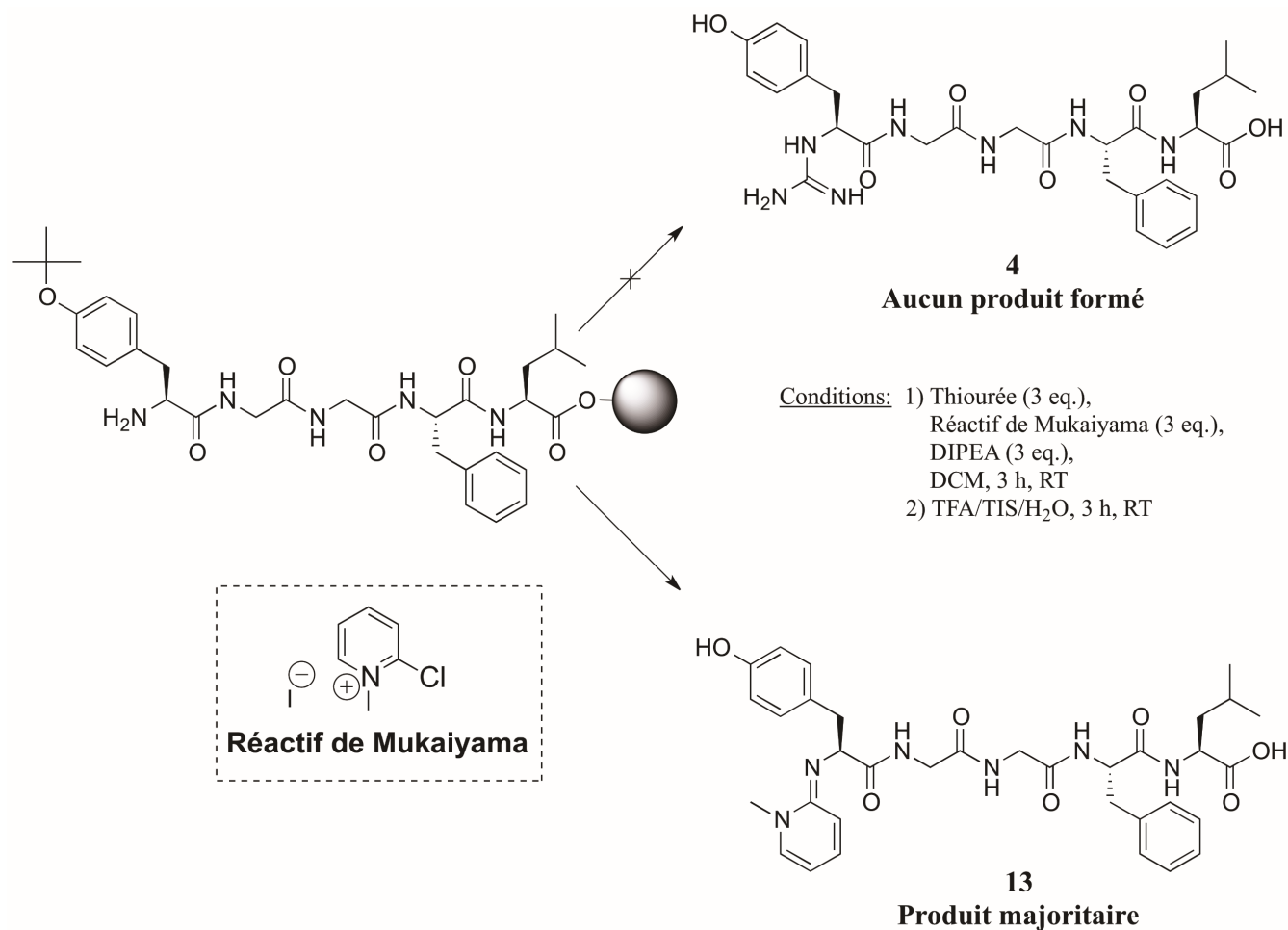


Schéma 6.

A l'inverse, la possibilité de réaliser cette transformation en phase solide apparaissait attrayante. Cependant, ces protocoles sont souvent associés à un coût excessif,²⁷⁹ une efficacité limitée,^{280,281} et la présence de réactions secondaires.^{282,283} Nous avons quand même tenté dans un premier temps de synthétiser le guanidyl en utilisant le réactif de Mukaiyama en présence d'urée (schéma 6). Malheureusement, aucun produit désiré n'a été formé et seul un pic majoritaire ayant une masse + 50 unités par rapport à la masse attendue a pu être observé en UPLC/MS. Il s'est plus tard avéré que cette masse correspondait au peptide auquel avait été greffé un groupe *N*-méthylpyridinium en position *N*-terminal (**13**). Bien qu'éloigné de l'objectif initial, il serait tout de même intéressant d'analyser les propriétés biologiques de ce composé.

Finalement, l'utilisation de chlorure de mercure II (HgCl_2) à la place du réactif de Mukaiyama en tant qu'agent réducteur, a permis cette fois d'obtenir le composé souhaité (**4**). Bien que l'utilisation de HgCl_2 , molécule hautement toxique, en étape finale de la synthèse d'un composé bioactif puisse sembler risquée (possiblement néfaste pour les test biologiques), cette toxicité est contrebalancée par sa bonne solubilité dans le DMF, ce qui devrait permettre de l'éliminer totalement après les étapes de lavage et de purification.

I.3. Résultats biologiques et discussion des résultats.

I.3.1. Affinité des peptides 1-8 sur MOPr/DOPr.

Une fois les différents dérivés d'enképhaline synthétisés, leur affinité sur les récepteurs DOPr et MOPr ont tous été vérifiés par des tests de radiocompétition sur des membranes cellulaires de rein humain embryonnaire (HEK, *Human Embryonic Kidney*) exprimant sélectivement chacun des deux récepteurs. Pour ce faire, une concentration croissante de Leu-enképhaline et des composés **2-8** ont été mis en compétition avec 1 nM de ^{125}I -Deltorphine II (DOPr) ou de ^{125}I -DAMGO (MOPr).

Le remplacement du carboxylate terminal par un tétrazole dans les composés **2** et **3** a eu pour résultat une légère baisse de l'affinité envers les deux récepteurs. Ces résultats sont en contradiction avec ceux avancés précédemment par Manturevicz,²⁷² où le composé **2** avait une valeur de K_i plus proche de celle de la Leu-enképhaline **1**. A l'inverse, la conversion de l'amine terminale par un groupe guanidyle sur le composé **4** augmente de façon significative l'affinité, avec une préférence pour MOPr. Une constatation similaire peut être faite pour le peptide **5**, où les deux mutations ont été combinées. L'ajout du tétrazole sur la structure du DADLE (**6**) diminue l'affinité du composé uniquement pour DOPr. En revanche cette modification est beaucoup plus tolérante dans le cas du DALET (**7**) avec des valeurs semblables à celles du composé **4**. Au regard des valeurs de K_i pour les molécules **2**, **3**, **6**, et **7**, il semblerait que l'insertion d'une stéréochimie D sur la Leucine-tétrazole produise une sélectivité inverse à celle du DADLE pour MOPr. Finalement, la combinaison des trois altérations (guanidyle en position *N*-terminal, *D*-Ala² et tétrazole en position *C*-terminal) sur le composé **8**, avec des valeurs biologiques proches de la Leu-enképhaline, permet d'obtenir le meilleur équilibre des tendances précédemment mentionnées (affinité, sélectivité).

Tableau 7. Affinité *in-vitro* des peptides **1-8**.

Entrée	Séquence	Ki ^a DOPr (nM)	Ki ^a MOPr (nM)	Sélectivité ^b
1	Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu	0,41 ± 0,08	0,32 ± 0,06	0,78
2	Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu(T)	1,24 ± 0,51	2,22 ± 0,55	1,79
3	Tyr-Gly-Gly-Phe- D -Leu(T)	3,10 ± 0,76	3,03 ± 0,52	0,98
4	Gua -Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu	0,29 ± 0,15	0,05 ± 0,02	0,17
5	Gua -Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu(T)	1,61 ± 0,44	0,25 ± 0,10	0,09
6	Tyr- D -Ala-Gly-Phe- D -Leu(T)	1,41 ± 0,50	0,29 ± 0,07	0,20
7	Tyr- D -Ala-Gly-Phe-Leu(T)	0,36 ± 0,13	0,24 ± 0,07	0,66
8	Gua -Tyr- D -Ala-Gly-Phe-Leu(T)	0,32 ± 0,07	0,20 ± 0,06	0,62

^aLes valeurs de Ki sont des moyennes de +/- S.E.M. de 3 à 5 expériences indépendantes. ^bLes valeurs de sélectivité sont calculées par le rapport Ki MOPr/Ki DOPr.

I.3.2. Efficacité cellulaire des peptides 1-8.

L'efficacité biologique des différents analogues synthétisés a ensuite été évaluée. Pour cela, nous nous sommes intéressés à deux voies de signalisations intracellulaires conséquentes à l'activation des récepteurs opioïdes par un agoniste : la voie adénylate cyclase et la voie β -arrestine. Lors de l'activation du récepteur, le biosenseur appelé EPAC, voit sa quantité d'AMPc liées à celui-ci diminuer, dû à l'inhibition de l'adénylate cyclase, par la protéine Gi relâchée. La deuxième est recrutée par le RCPG suite à la phosphorylation du récepteur en *N*-terminal, et est responsable du phénomène de tolérance aux opioïdes. Ainsi, l'obtention d'agonistes biaisés capables d'activer la première voie de signalisation tout en limitant la deuxième serait d'un grand intérêt thérapeutique. Afin d'étudier ces deux phénomènes, la technologie BRET a été utilisée (voir Introduction, I.5.3. pour une description complète).

Tous les analogues testés présentent un profil agoniste total pour EPAC sur les deux récepteurs, avec des valeurs similaires à celle de la Leu-enképhaline, à l'exception des composés **2** et **3**. Cela peut être imputé

par la plus faible affinité de ces derniers. En effet, les données présentées au **tableau 8** suivent globalement la même tendance que le **tableau 7**, tant pour l'EC₅₀ que pour la sélectivité.

Tableau 8. Efficacité biologique *in-vitro* des peptides **1-8** sur la voie de signalisation EPAC.

Entrée	Séquence	EC ₅₀ ^a EPAC	EC ₅₀ ^a EPAC	Sélectivité ^b
		DOPr (nM)	MOPr (nM)	
1	Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu	0,15 ± 0,03	1,89 ± 0,45	12,6
2	Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu(T)	2,87 ± 0,84	15,7 ± 6,10	5,41
3	Tyr-Gly-Gly-Phe- D -Leu(T)	3,32 ± 2,30	10,4 ± 4,80	3,13
4	Gua -Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu	0,18 ± 0,10	0,74 ± 0,33	4,11
5	Gua -Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu(T)	0,85 ± 0,24	2,33 ± 1,04	2,74
6	Tyr- D -Ala-Gly-Phe- D -Leu(T)	0,49 ± 0,04	1,07 ± 0,34	2,18
7	Tyr- D -Ala-Gly-Phe-Leu(T)	0,25 ± 0,12	0,60 ± 0,38	2,40
8	Gua -Tyr- D -Ala-Gly-Phe-Leu(T)	0,10 ± 0,06	0,38 ± 0,29	3,80

^aLes valeurs d'EC₅₀ sont des moyennes de +/- S.E.M. de 3 à 5 expériences indépendantes. ^bLes valeurs de sélectivité sont calculées par le rapport EC₅₀ MOPr/EC₅₀ DOPr.

Concernant le recrutement de la β -arrestine (**Tableau 9**), nous avons été heureux de constater que tous les composés ont des valeurs d'EC₅₀ inférieures à celle de la Leu-enképhaline, à l'exception du composé **4** modifié uniquement en *N*-terminal. Ainsi, il est apparu que le remplacement du carboxylate par un tétrazole avait pour résultat de limiter de façon significative le recrutement de la β -arrestine. Le résultat le plus spectaculaire a été observé dans le cas des peptides **3** et **5**. Cet effet semble toutefois être limité par l'inclusion d'une *D*-alanine en position 2, comme le témoigne les analogues **6-8**.

Tableau 9. Efficacité biologique *in-vitro* des peptides **1-8** sur le recrutement de la β -arrestine.

Entrée	Séquence	EC ₅₀ ^a β -arrestine	EC ₅₀ ^a β -arrestine
		DOPr (nM)	MOPr (nM)
1	Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu	2,66 \pm 1,62	485 \pm 81,6
2	Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu(T)	27,5 \pm 9,06	2904 \pm 1562
3	Tyr-Gly-Gly-Phe- D -Leu(T)	92,4 \pm 19,2	1848 \pm 546
4	Gua -Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu	5,32 \pm 1,96	304 \pm 44,8
5	Gua -Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu(T)	71,6 \pm 18,9	1440 \pm 603
6	Tyr- D-Ala -Gly-Phe- D -Leu(T)	17,9 \pm 7,19	356 \pm 178
7	Tyr- D-Ala -Gly-Phe-Leu(T)	3,02 \pm 0,46	685 \pm 117
8	Gua -Tyr- D-Ala -Gly-Phe-Leu(T)	13,2 \pm 2,69	278 \pm 831

^aLes valeurs d'EC₅₀ sont des moyennes de \pm S.E.M. de 3 à 5 expériences indépendantes.

I.3.3. Rationalisation des propriétés pharmacodynamiques par modélisation moléculaire.

Afin de mieux comprendre les résultats obtenus dans les deux sections précédentes, les différentes modifications effectuées ont été modélisées dans le récepteur DOPr (**Figure 56**). Pour ce faire, le modèle créé au laboratoire a été repris, et les modifications ont été apportées à même la structure de la Leu-enképhaline grâce au module d'édition du logiciel MOE. Les différentes expériences de docking ont ensuite été réalisées en laissant les chaînes latérales du récepteur, libres dans un rayon de 15 Å.

Comparé au carboxylate de la Leu-enképhaline (**Figure 56a**), un léger déplacement du tétrazole est observable pour le composé **2** (**Figure 56b**). Il en résulte une perte de l'interaction avec Trp284, qui pourrait éventuellement expliquer la plus faible affinité de ce composé. En revanche, l'ajout d'une *D*-alanine en position 2 sur le composé **6** (**Figure 56d**), provoque une rigidification de la conformation du peptide par la stabilisation du coude β entre le deuxième et le quatrième amide. La pénétration légèrement plus profonde de la molécule dans le site actif qui en découle, permet au tétrazole de s'accommoder plus facilement aux résidus Arg291 et Trp284 afin d'adopter un mode de liaison quasi identique à celui de la Leu-enképhaline, nous éclairant ainsi sur les valeurs des analogues **6**, **7** et **8**.

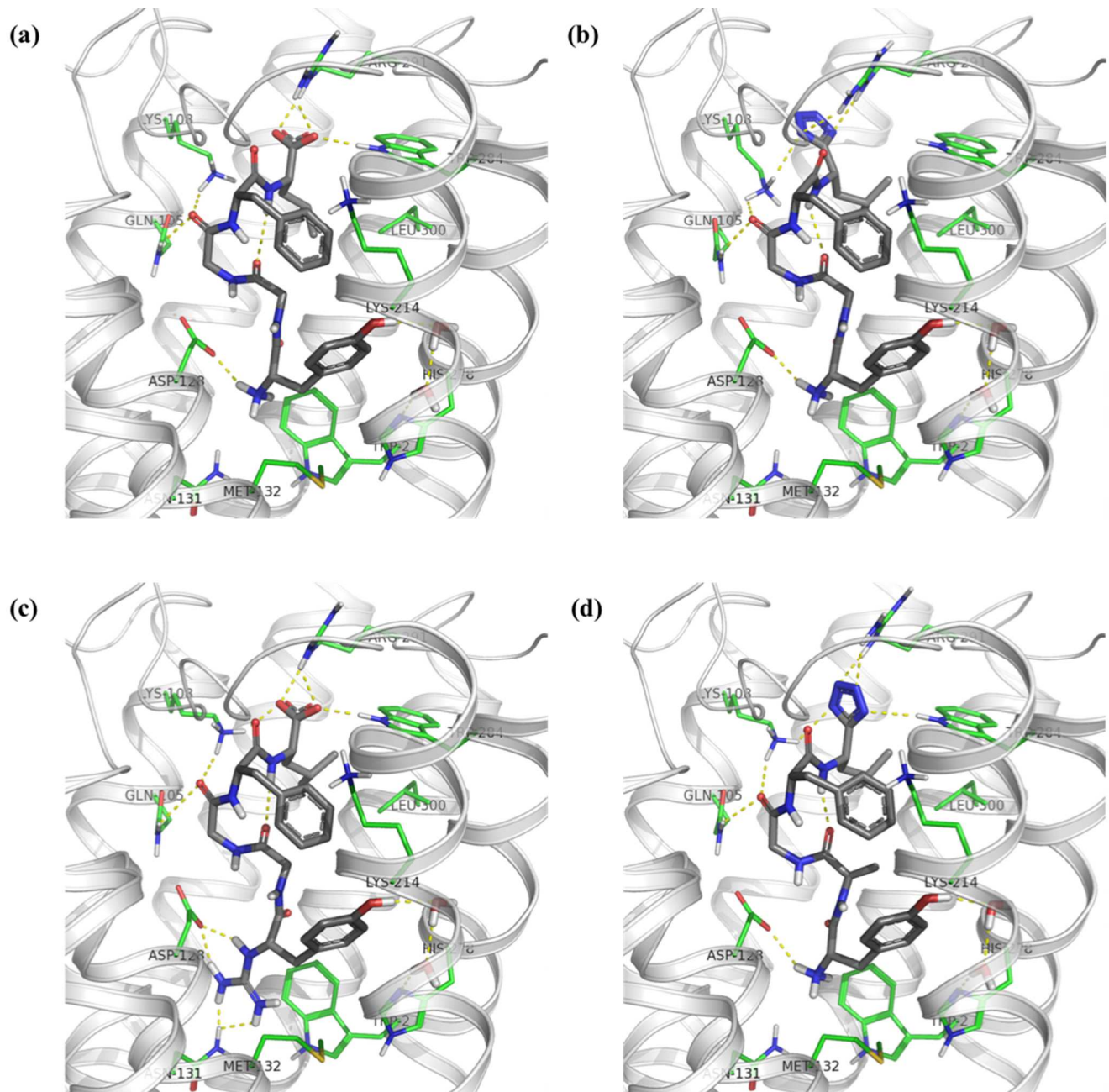


Figure 56. Modélisation moléculaire des différentes modifications sur le récepteur DOPr (4N6H). (a) Leu-enképhaline (composé **1**) ; (b) Leu-enképhaline-tétrazole (composé **2**) ; (c) Guanylyl-Leu-enképhaline (composé **4**) ; (d) D-Alanine-Leu-enképhaline-tétrazole (composé **7**). Les liaisons hydrogènes formées entre le ligand et le récepteur sont représentées par des pointillés jaune.

La partie « message » du récepteur est somme toute assez similaire dans les quatre poses, y compris lors du remplacement de l'amine par une guanidine sur le composé **4** (**Figure 56c**). En effet, il est possible de constater que le groupe guanidinium se positionne de façon adéquate afin de former un double pont salin avec Asp128. Le résidu Asn131 connu pour stabiliser l'état inactif de DOPr via un réseau polaire avec le site orthostérique sodium, est ici également réquisitionné par le groupe guanidyle poussant probablement encore plus le récepteur vers une de ses conformations actives. Toutefois, une conclusion différente avait été avancée par l'équipe du Pr Schiller, où un décalage de la molécule était constaté lors de la présence du groupe guanidyle en *N*-terminal.²⁷⁶ Cette différence peut s'expliquer par le recours au docking induit dans notre cas, ce qui permet au récepteur de s'adapter au ligand de la même façon que le ferait une protéine dans la nature.

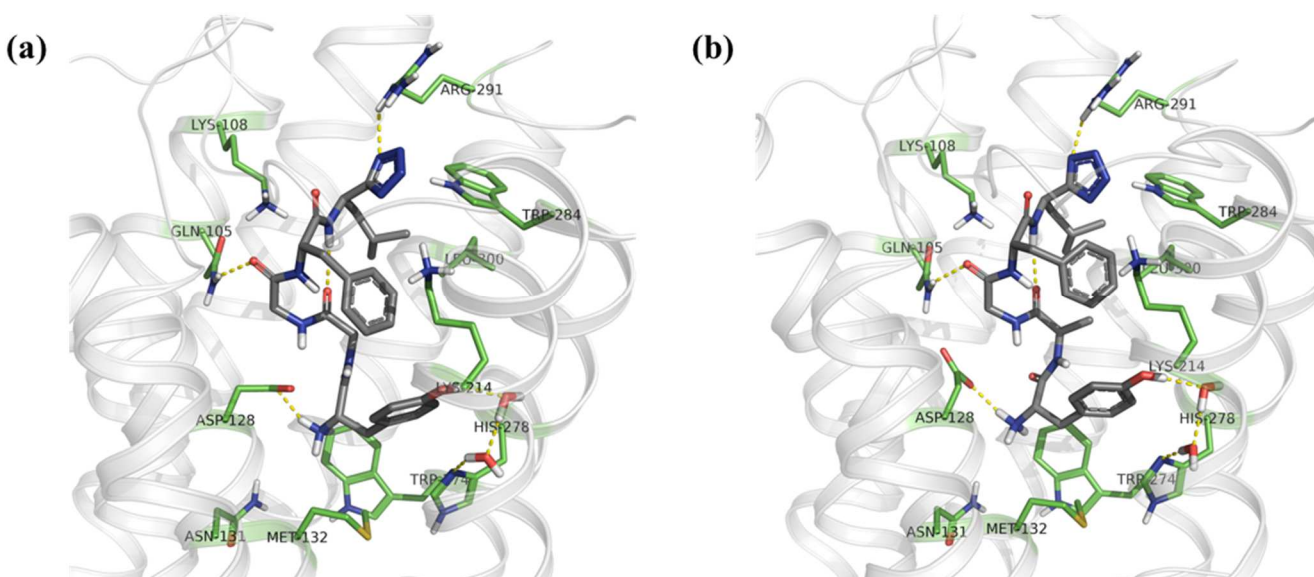


Figure 57. Modélisation moléculaire des composés (a) D-Leu-enképhaline tétrazole (composé **3**) ; (b) D-Ala²-D-Leu⁵-enképhaline-tétrazole (composé **6**) sur le récepteur DOPr (4N6H).

Les composés **3** et **4** présentés en **figure 57**, comportant une *D*-Leucine-tétrazole en position 5 semblent moins à même d'orienter correctement le noyau tétrazole, ce qui pourrait expliquer leurs plus faibles valeurs d'affinités et d'efficacités comparés à leur analogues **2** et **6** possédant une Leucine-tétrazole.

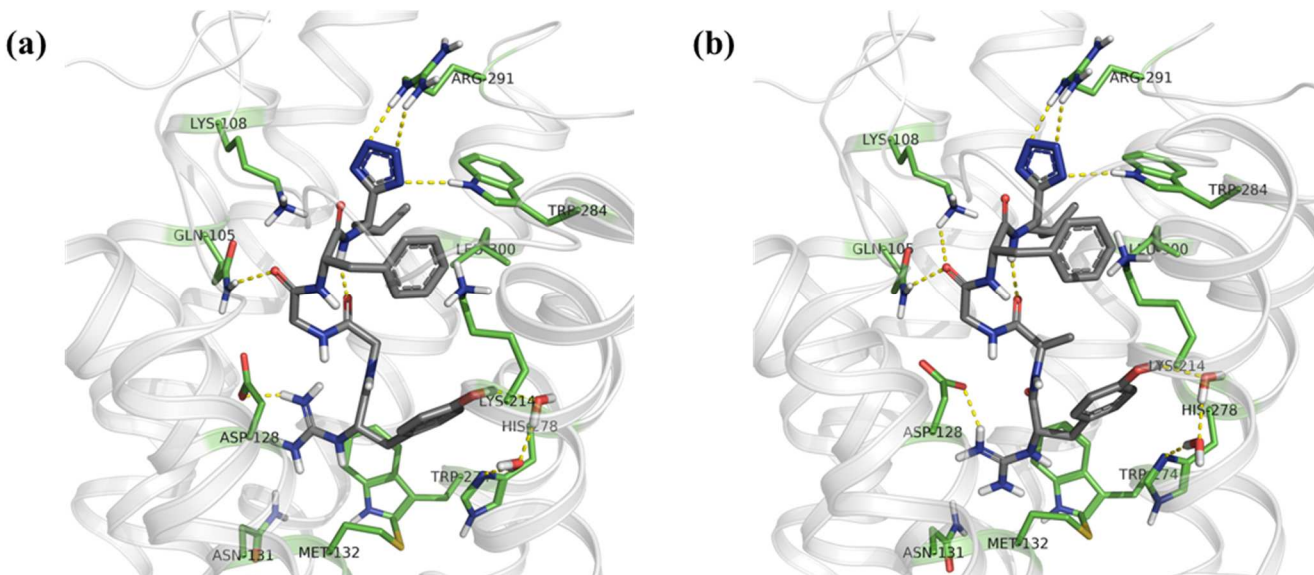


Figure 58. Modélisation moléculaire des composés (a) Guanidyl-Leu-enképhaline-tétrazole (composé **5**) ; (b) Gua-D-Ala²-D-Leu⁵-enképhaline-tétrazole (composé **8**) sur le récepteur DOPr (4N6H).

L'insertion simultané d'un guanidyle et d'un tétrazole sur les molécule **5** et **8**, permet de faire pénétrer les ligands plus profondément dans le récepteur, de façon à ce que le tétrazole puisse s'accommoder plus efficacement avec Arg291 et Trp284. De plus, l'ajout supplémentaire d'une *D*-alanine sur la molécule **8** a eu pour résultat de positionner le guanidyle de façon similaire au composé GuaLE (**4**)

I.3. Propriétés pharmacocinétiques.

Ayant à notre disposition plusieurs molécules possédant un profil pharmacodynamique sur DOPr équivalent ou amélioré, nous avons voulu valider l'influence de chacune des modifications sur leurs propriétés pharmacocinétiques. Ainsi, les composantes physico-chimiques des différents peptides ont d'abord été calculés et/ou mesurés, avant de vérifier leur stabilité plasmatique.

I.3.1 Paramètres physico-chimiques.

Comme il l'a été indiqué plus tôt, le logD est une mesure facile à réaliser, et représente le rapport de la concentration d'un composé dans l'octanol sur la concentration dans une phase aqueuse (ici le PBS

tamponné à pH physiologique 7,4) et représente un premier indice de la perméabilité dans le cerveau (bien que non suffisant).²⁸⁴ Leurs valeurs pour les peptides **1-8** ont été calculées *in silico* et mesurées expérimentalement. Bien que les valeurs calculées et mesurées soient relativement proches pour la Leu-enképhaline **1** et le peptide **8**, elles diffèrent grandement pour tous les autres dérivés. L'omission du repliement des peptides dans l'octanol, des facteurs stéréochimiques ou des interactions non-covalentes par le logiciel, pourrait expliquer ce décalage.^{285,286} Tous les ligands synthétisés présentent un logD augmenté par rapport à la Leu-enképhaline, validant ainsi notre première hypothèse. L'effet le plus notable a été obtenu pour l'analogue **8** avec un gain de deux unités de log. Avec une telle valeur, le composé **8** se situe au-dessus du logD mesuré de la codéine, laissant présager une bonne distribution dans le cerveau.²⁸⁷

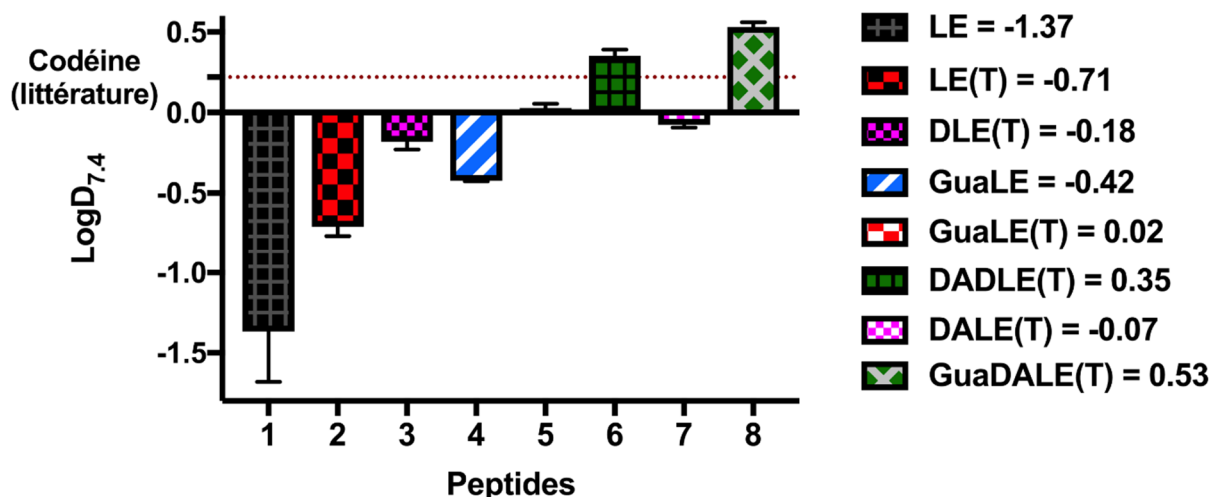


Figure 59. Coefficient de partition des composés **1-8**.

La surface totale de l'aire polaire (tPSA), représentant la somme de toutes les contributions polaires d'une molécule, est également un bon indice pour la prédiction du transport d'un médicament à travers la BHE.²⁸⁸ Comme l'ajout de nombreux atomes polaires le laissait prévoir, tous les composés possèdent des valeurs de tPSA supérieures à celle du peptide parent. Avec des valeurs situées aux dessus de 200 Å², on est bien loin de la limite de 90 Å². Il faut toutefois considérer que cette règle statistique est plus pertinente pour des petits ligands, que pour des peptides désobéissant déjà à la plupart des règles de Lipinski.^{268,288,289} De plus, plusieurs composés avec des tPSA similaires ont démontré une activité sur le système nerveux central.^{194,290,291}

Il peut être également intéressant d'observer les temps de rétention des différents analogues en HPLC. En effet, la rétention des composés en fonction de leur lipophilicité croissante sur la silice C18, permet parfois d'avoir une estimation de leur polarité. Malheureusement peu des temps de rétention relevés ont corrélé avec les autres paramètres physico-chimiques.

Tableau 10. Paramètres pharmacocinétiques calculés et mesurés des peptides 1-8.

Entrée	Séquence	Tr (min)	logD _{7,4}	clogD ^a	tPSA ^a (Å ²)	LLE ^b
1	Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu	16,05	-1,37	-1,86	204,4	11,2
2	Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu(T)	15 ,80	-0,71	-1,57	215,83	9,25
3	Tyr-Gly-Gly-Phe- D -Leu(T)	17,13	-0,18	-1,57	215,83	8,66
4	Gua -Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu	16,62	-0,42	-1,58	240,40	10,2
5	Gua -Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu(T)	16,42	0,02	-0,13	239,80	9,09
6	Tyr- D -Ala-Gly-Phe- D -Leu(T)	17,41	-0,07	-1,00	215,83	9,38
7	Tyr- D -Ala-Gly-Phe-Leu(T)	16,21	0,35	-1,00	215,83	9,25
8	Gua -Tyr- D -Ala-Gly-Phe-Leu(T)	16,84	0,53	0,44	239,80	9,47

^aLes valeurs de clogD et de tPSA ont été calculé par la suite logicielle ChemAxon. ^bLLE : Efficacité Lipophile d'un Ligand calculée par la formule $LLE = pEC_{50} - \log D_{7,4}$.

Bien que tous ces paramètres soient encourageants quant à la perméabilité du composé **8** à travers la BHE, il faut garder en tête qu'ils ne concernent que le passage passif à travers cette membrane. Cependant l'éventuelle interaction favorable du groupe guanidyle du composé **8** avec l'albumine, pourrait venir s'ajouter à ce phénomène afin d'augmenter l'accès au cerveau.^{274,275}

Dans un dernier temps, l'efficacité lipophile des ligands (LLE, *Ligand Lipophilicity Efficiency*) a été mesurée. Ce paramètre, combinant à la fois l'activité d'un composé avec sa lipophilicité, permet d'établir l'efficacité de la modification d'un produit sans prendre en compte sa contribution lipophile.²⁹² Il est établi qu'un bon candidat médicament devrait idéalement se situer aux dessus de 6 ($pK_i > 8$ et $\log P > 2$).²²⁹ Tous nos composés se situent aux dessus de cette limite, avec la meilleure valeur obtenue pour le composé **4**.

I.3.2 Stabilité plasmatique.

La lipophilicité de nos composés établis, nous avons voulu étudier l'influence de chacune des modifications sur la stabilité plasmatique. Ainsi, les peptides **1**, **2**, **4**, **5**, **7** et **8** ont été infusés dans une solution de plasma murin à 37 °C, conformément au protocole établi au préalable au laboratoire.²¹⁶

Le remplacement de l'acide carboxylique par un tétrazole (composé **2**) n'améliore pas la stabilité plasmatique avec un temps de demi vie comparable à celui du composé **1**. Ceci était prévisible, étant donné que les aminopeptidases et les enképhalinases attaquent essentiellement au niveau du premier et du troisième amide.²⁹³ En revanche, l'homologation en *N*-terminal par un guanidyle (composé **4**) a résulté en une légère amélioration de la stabilité. L'ajout d'une *D*-Alanine sur le composé **7** a permis d'augmenter la stabilité jusqu'à 3 h, confirmant l'aspect critique de cette position. Finalement, l'ajout simultané d'un guanidyle et d'un tétrazole sur une même molécule (composé **7** et **8**) a eu pour résultat de conserver l'intégrité des peptides, même après 6 h.

Ainsi, la protection concomitante des sites *C*-terminal et *N*-terminal est apparue essentielle afin d'obtenir une stabilité optimale, tandis que la protection uniquement sur un des deux côtés offre des résultats plus limités, voire inexistantes.

Tableau 11. Stabilité plasmatique (*ex vivo*) des peptides **1**, **2**, **4**, **5**, **7**, **8**

Entrée	T _{1/2} (min)	Fragments de dégradation (Temps de première apparition) ^a
1	1,83	Gly-Gly-Phe-Leu (1 min)
2	1,45	Gly-Gly-Phe-Leu (T) (1 min)
4	15,77	Gly-Gly-Phe- Leu (1 min)
5	> 6 h	N.O.
7	3 h	Gly-Gly-Phe-Leu(T) (60 min)
8	> 6 h	N.O.

^aLes fragments de dégradation ont été identifiés par spectroscopie de masse

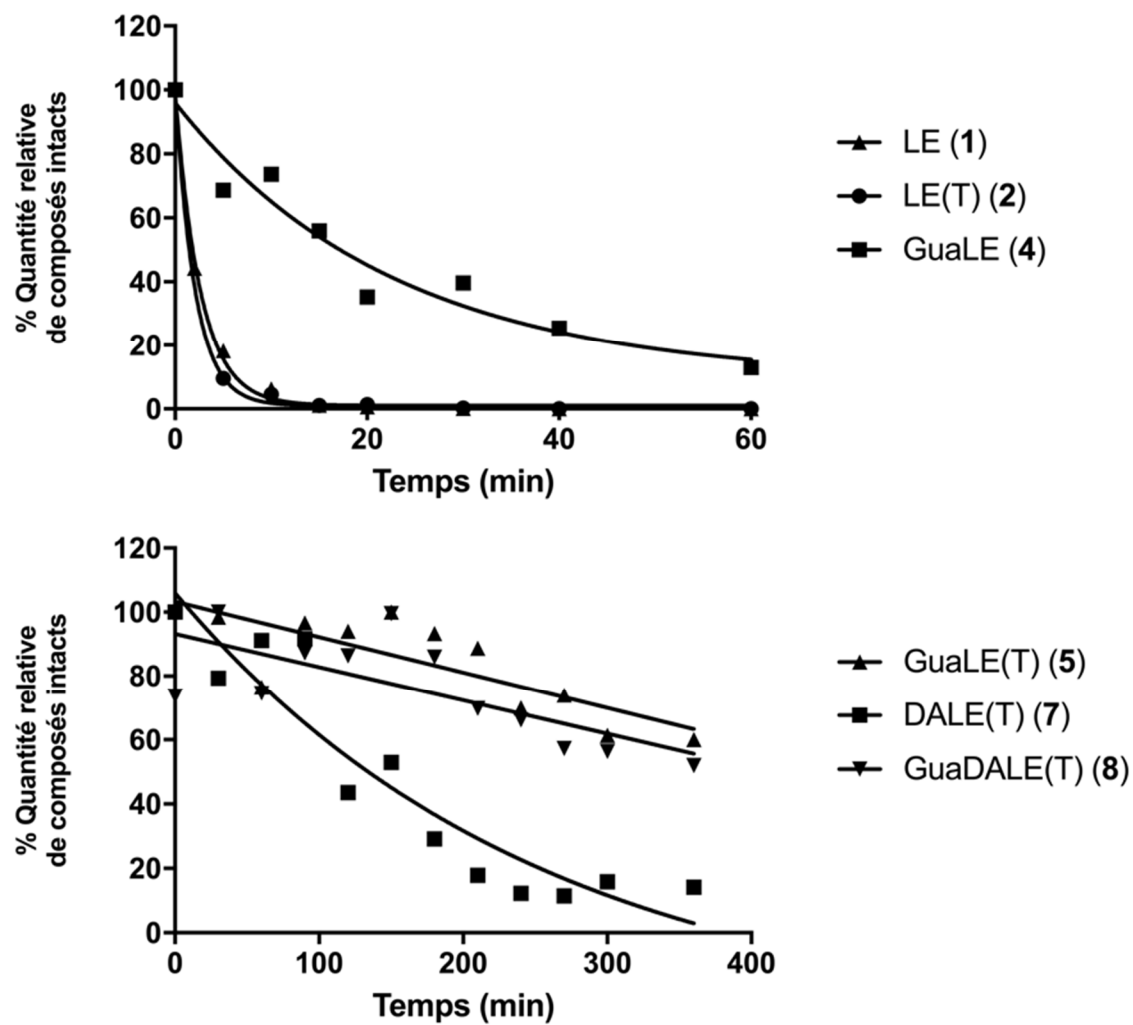


Figure 60. Stabilité (*ex vivo*) plasmatique des peptides 1, 2, 4, 5, 7 et 8 à 37 °C.

I.4. Conclusions et perspectives.

Dans le cadre de cette étude, l'influence de plusieurs modifications isostériques en position *N*-terminal et *C*-terminal sur les propriétés pharmacodynamiques et pharmacocinétiques de la Leu-enképhaline ont été testées. Après une synthèse en trois étapes de la Leucine-tétrazole, celle-ci a été attachée sur support solide avant de poursuivre la synthèse peptidique des analogues désirés, de manière classique. La fonction guanidyle a, quant à elle, été introduite directement en phase solide, simplifiant ainsi la synthèse et la purification des composés portant cette modification.

Les tests d'affinité et d'efficacité sur DOPr et MOPr qui ont suivi ont révélé des valeurs similaires à celle de la Leu-enképhaline, à l'exception des composés **2** et **3** sur lesquels uniquement le carboxylate avait été remplacé par un tétrazole. L'ajout d'une *D*-Alanine en position 2 a permis de limiter cet effet, tandis que l'homologation de l'amine terminale par une guanidine a résulté en une meilleure affinité non sélective. Lorsqu'un guanidyl, une *D*-Alanine et un tétrazole ont été ajoutés parallèlement dans le même analogue **8**, un meilleur équilibre de ces différentes tendances a pu être observé, avec des valeurs d'affinité et de sélectivité similaire à la Leu-Enképhaline. Concernant le recrutement de la β -arrestine, l'introduction d'un tétrazole en *C*-terminal semble limiter ce processus à notre grand plaisir.

Dans la deuxième partie, les mesures de lipophilicité effectuées ont révélé une augmentation générale du logD, en particulier pour le composé **8** pour lequel un gain de 2 unités a été constaté. La substitution par le tétrazole n'a pas démonté d'effet sur la stabilité plasmatique, tandis que le guanidyle a apporté une légère amélioration. En revanche, la combinaison des deux mutations semble être suffisante pour protéger efficacement le peptide de façon spectaculaire.

Ainsi, toutes ces données suggèrent que l'approche utilisée, en permettant de conserver le profil pharmacocinétique du peptide parent, tout en améliorant de façon significative la lipophilicité et la stabilité, pourrait être une stratégie viable afin de transformer des agonistes DOPr efficaces, en de meilleurs candidats médicaments. Bien que ces résultats soient très encourageants, il faut garder en tête que notre objectif au laboratoire, reste le développement d'agonistes sélectifs DOPr. Cet aspect devra donc être la prochaine étape à prendre en considération, avant d'envisager d'éventuels tests *in vivo*. On pourrait envisager de placer ces modifications sur des composés possédant déjà une meilleure sélectivité DOPr.

Concernant l'analogue **13** obtenu par hasard lors des essais de guanidylation, les résultats préliminaires (**Tableau 12**) suggèrent une affinité et une activité sur DOPr similaires au composé **1**.

Tableau 12. Propriétés pharmacodynamiques du peptides **1**, **4** et **13**.

Entrée	Ki ^a DOPr (nM)	Ki ^a MOPr (nM)	MOPr/ DOPr ^b	EC ₅₀ ^c EPAC DOPr (nM)	EC ₅₀ ^c EPAC MOPr (nM)	EC ₅₀ ^c β-arr DOPr (nM)	EC ₅₀ ^c β-arr MOPr (nM)
1	0,46 ± 0,09	0,37 ± 0,09	0,80	0,15 ± 0,03	0,89 ± 0,45	2,66 ± 1,62	485 ± 81,6
4	0,29 ± 0,15	0,05 ± 0,03	0,17	0,18 ± 0,10	0,74 ± 0,33	5,32 ± 1,96	304 ± 44,8
13	0,30 ± 0,06	0,17 ± 0,04	5,6	0,19 ± 0,25	18,1 ± 0,4	1,54 ± 0,57	123 ± 63,0

^aLes valeurs de Ki sont les moyennes de +/- S.E.M. de 3 à 5 expériences indépendantes. ^bLes valeurs de sélectivité sont calculées par le rapport Ki MOPr/Ki DOPr. ^cLes valeurs d'EC₅₀ sont la moyenne de +/- S.E.M. de 3 à 5 expériences indépendantes.

Ce résultat peut s'expliquer par le fait qu'avec un pKa aux alentours de 10, l'espèce majoritaire est constamment protonée à pH physiologique au niveau de l'amine sp². Ainsi, ce nouveau motif agit comme une rigidification de la fonction guanidyl précédemment introduite. Malgré le fait que le recrutement de la β-arrestine semble inchangé comparé au composé **4**, il est nécessaire de prendre en considération le fait que seul une activation partielle de cette voie de signalisation a été observée pour MOPr. Il est donc fort probable que ce nouveau composé possède un profil biaisé en faveur de la voie AMPc (**Figure 61a et 61b**).

La taille imposante de cette fonction aurait pu laisser craindre la conversion du composé vers un antagoniste, toutefois la modélisation de cette molécule dans le récepteur DOPr (**Figure 61c**) semble indiquer que le noyau pyridyle est capable de se positionner adéquatement afin de ne pas engendrer de gêne stérique sur Trp174 et Met132.

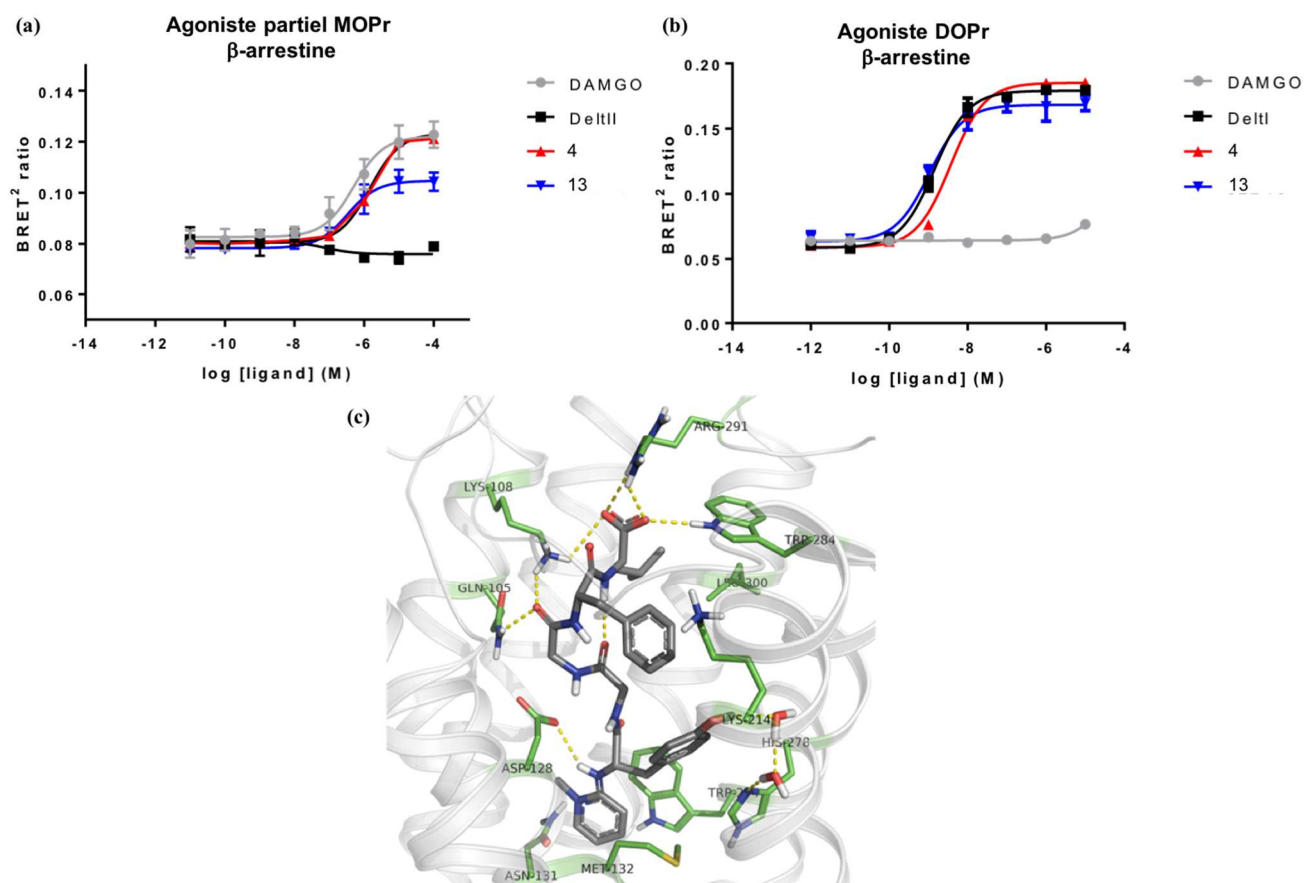


Figure 61. Recrutement de la β -arrestine du composé **13** sur le récepteur MOPr (a) ou le récepteur DOPr (b) Docking induit du composé **13** dans le récepteur DOPr 4N6H (c)

Cependant le logD mesuré de ce composé, avec une valeur de -0,74 semble apporter une contribution lipophile moindre que le groupement guanidyl (logD = -0,42). Il serait toutefois intéressant de réaliser la synthèse des analogues portant à la fois le *N*-méthylpyridinium en *N*-terminal et le tétrazole en *C*-terminal (**Figure 62**). Les tests de stabilité plasmatiques indiquent un temps de demi-vie de 30 min

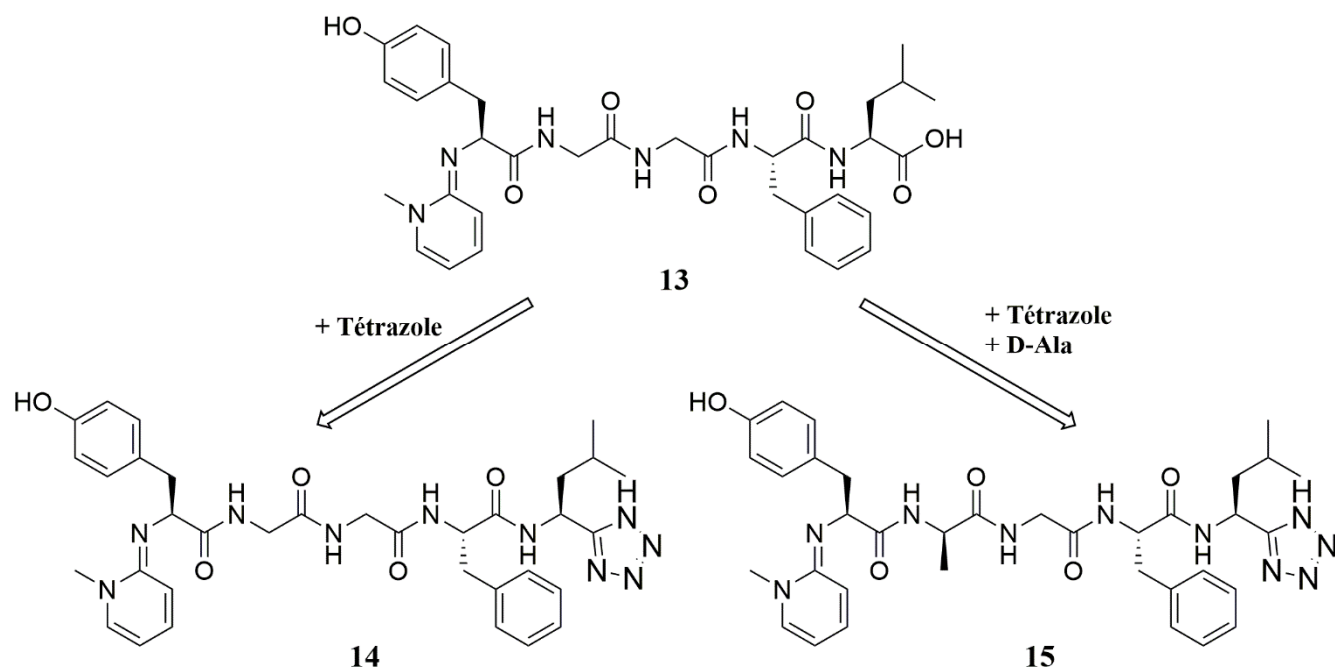


Figure 62. Proposition de développement de la série.

Au cours de la recherche d'isostères d'acide carboxylique, le 5-oxo-1,2,4-oxadiazole est apparu comme un deuxième candidat envisageable avec un pKa de 6 et un clogD de -1. À y regarder de plus près, cette fonction pourrait même donner des résultats encore plus intéressants quant à l'affinité pour DOPr. En effet, contrairement au tétrazole ou le tautomère est délocalisé, celui-ci est peuplé 100 % du temps à un seul endroit sur le 5-oxo-1,2,4-oxadiazole (**Figure 63**). De plus, le carbonyle en position 3 pourrait éventuellement aller chercher de nouvelles interactions avec le récepteur (**Figure 64**).

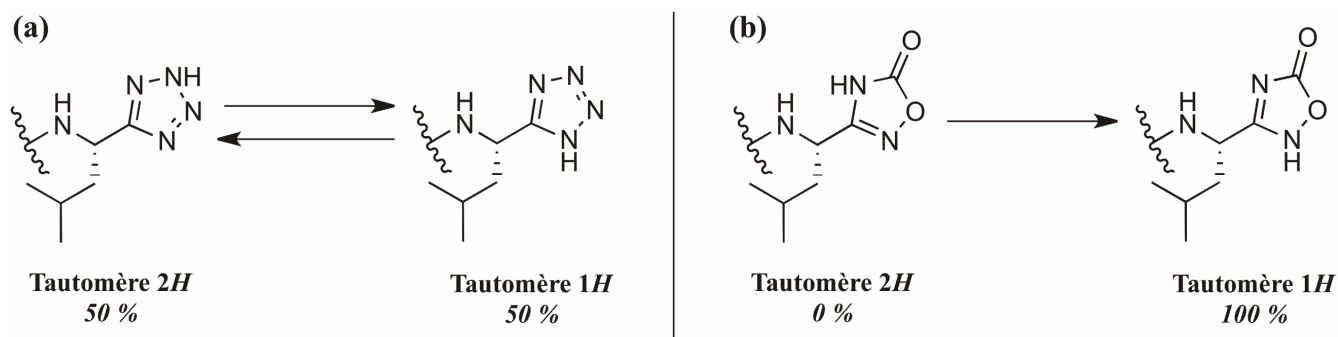


Figure 63. Équilibre tautomérique à pH 7,4 du (a) tétrazole (b) 5-oxo-1,2,4-oxadiazole. Les populations relatives ont été calculé avec la suite logicielle Chemaxon.

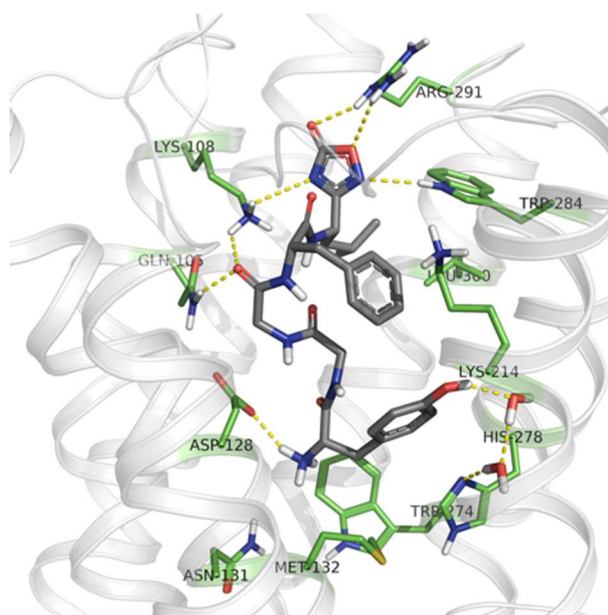
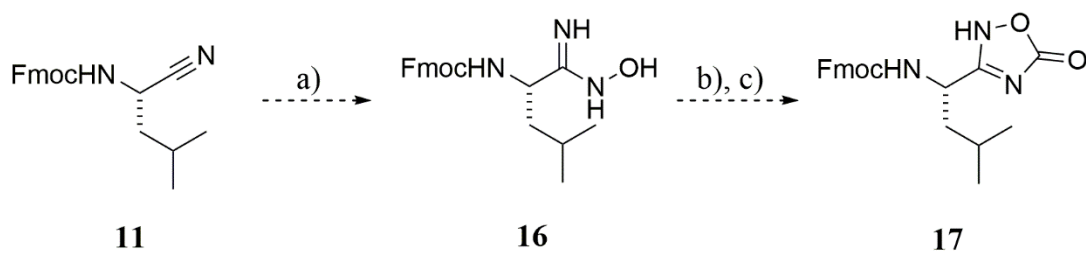


Figure 64. Docking induit de la molécule proposée Leu-Enképhaline-5-oxo-1,2,4-oxadiazole dans le récepteur DOPr 4N6H.

Cette leucine modifiée pourrait être facilement synthétisée en deux étapes en partant de la Fmoc-Leucine-cyano **11** (Schéma 7).



a) NH_3OH (4,0 eq), Ethanol, RT, 16 h; b) Chloroformate d'éthyl, THF, RT, 16 h;
c) NaOH (5 %), Acide acétique, RT, 24 h.

Schéma 7.

CHAPITRE 2 : ÉTUDE DE STRUCTURE-ACTIVITÉ EN POSITION 4 DE LA LEU-ENKÉPHALINE

2.1. Introduction

2.1.1 Exploration de Phe⁴ dans la littérature.

Les précédents travaux au laboratoire ont permis de proposer un premier modèle de la conformation active de la Leu-enképhaline dans le récepteur DOPr. Néanmoins une incertitude plane toujours sur le possible positionnement de la phénylalanine en position 4 du peptide. En effet, malgré que le squelette de la Leu-enképhaline soit stabilisé par un coude β , la chaîne latérale de Phe⁴ est connue pour posséder une forte mobilité.^{247,248} Plusieurs équipes suggèrent que la proximité des deux cycles aromatiques (< 7 Å) du peptide favoriserait DOPr, alors qu'elle serait nuisible pour MOPr.^{249–251,294,295} Des mesures de conformation du DADLE (sélectif à DOPr) en phase gazeuse confirment d'ailleurs cette hypothèse, où les deux cycles sont dans le même voisinage, à l'inverse de la Leu-enképhaline (**Figure 65**).²⁵⁴

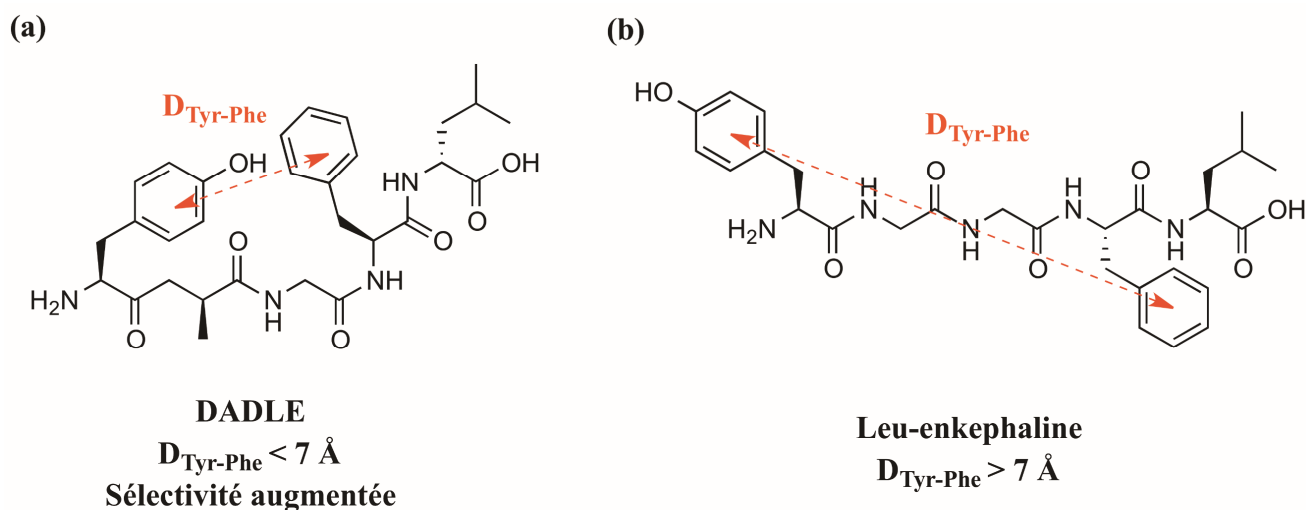
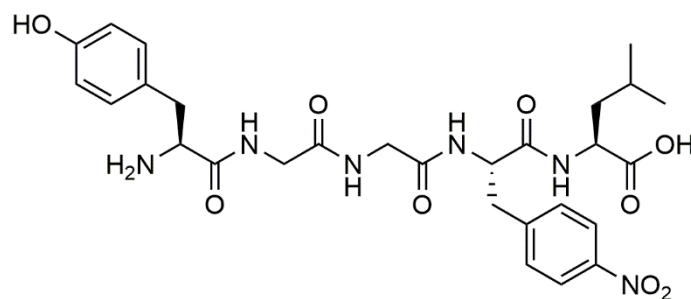


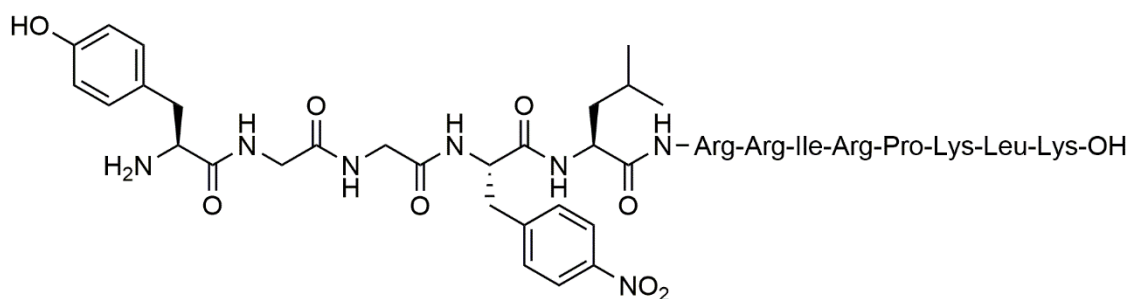
Figure 65. Les conformations du DADLE (a) et de la Leu-enképhaline (b) en phase gazeuse, semblent suggérer que la proximité spatiale des noyaux aryles favorise la sélectivité pour DOPr.

Les modèles proposés par Mosberg pour les macrocycles sélectifs à DOPr JOM-13 et DPDPE, présentent également cette caractéristique.²³⁷ Cependant, le fort degré de liberté de cette chaîne latérale ne nous permet pas de confirmer cette hypothèse dans le cas des peptides linéaires. Il est même fort possible qu'elle change d'emplacement d'un peptide à un autre.

Afin d'étudier les exigences structurales autour de cette position, Schiller et al. ont introduit en 1982 un groupement nitro en position *para* de la phénylalanine sur la Leu-enképhaline, ainsi que sur la séquence commune avec la dynorphine, ligands sélectifs KOPr.²⁹⁶ Là où cette modification a résulté en une meilleure affinité sur MOPr et DOPr pour l'énképhaline, l'inverse s'est produit dans le cas de la dynorphine. L'année suivante, la même équipe a reproduit cette stratégie en l'étendant cette fois à plusieurs ligands sélectifs à MOPr ou DOPr, et une conclusion similaire a pu être établie.²⁹⁷ Il est ressorti de cette étude, que contrairement à MOPr et DOPr qui semblent posséder un site actif semblable pour Phe⁴, KOPr adopte un environnement différent.



Phe⁴(*p*-NO₂)-Leu-Enkephaline
Efficacité améliorée sur MOPr et DOPr



Phe⁴(*p*-NO₂)-Dynorphine
Diminution de l'efficacité sur MOPr et DOPr

Figure 66. La nitration en *para* de Phe⁴ sur la Leu-énképhaline et la dynorphine se traduit de façon différente au niveau l'efficacité biologique pour MOPr et DOPr.

À peu près à la même époque, Maeda et al. ont introduit divers substituants fluorés sur les cycles aromatiques de Tyr¹ et Phe⁴.²³⁰ De cette série, seul le composé comprenant un atome de fluor en *para* de Phe⁴ s'est démarqué au niveau des valeurs d'efficacité biologique. Une explication de l'efficacité de cette molécule a été avancée en 2015 par Rosa et al. dans une étude où les auteurs ont réalisé une halogénéation systématique en position *ortho* et *para* de Phe⁴.²⁹⁸ En effet, la densité électronique légèrement négative du fluor en position *para* (dans l'axe de la liaison C-F), permet à celui-ci d'agir en tant qu'accepteur de liaison hydrogène avec T²⁵⁶.²⁹⁹ Les autres halogènes possédant en revanche la propriété inverse (charge partielle positive dans l'axe C-X, appelé trou sigma), seraient incapables de reproduire cette interaction avec la thréonine et créeraient alors de la gêne stérique en diminuant l'affinité au récepteur de façon inversement proportionnelle à la taille de l'halogène.³⁰⁰

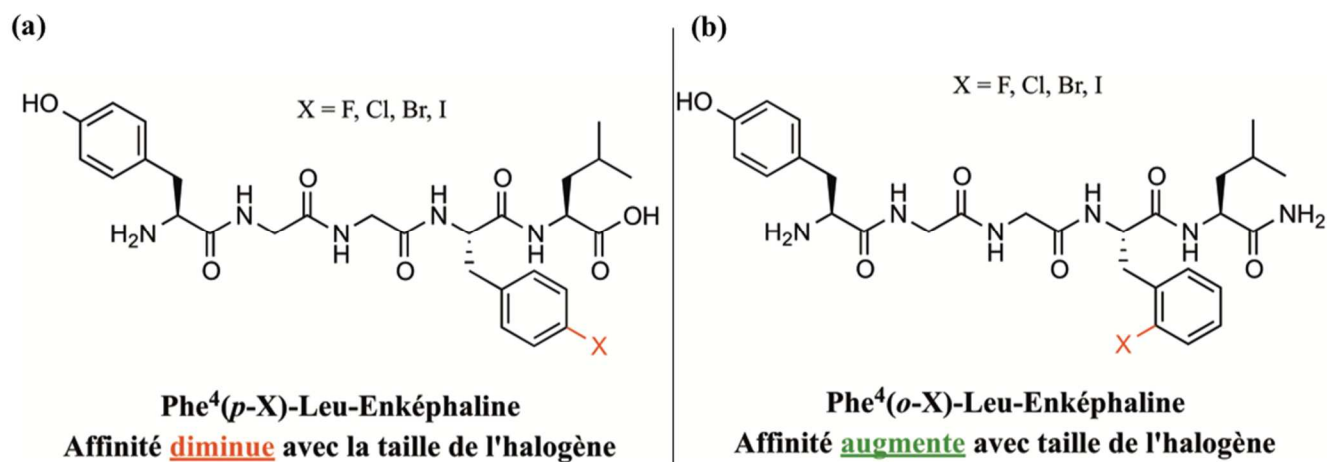


Figure 67. L'halogénéation de Phe⁴ modifie la liaison de la Leu-enképhaline selon deux modes différents : Formation d'une liaison hydrogène en position *para* (a) ou formation d'une liaison halogène en *ortho* (b) avec le squelette du récepteur DOPr.

Concernant la position *ortho* de Phe⁴, l'inverse a pu être constaté où la formation d'un lien halogène avec le squelette de la protéine, favorisé par la taille croissante de l'halogène est cette fois bénéfique pour l'affinité. Il est toutefois important de noter que les auteurs ont choisi de docker une conformation étendue de la Leu-enképhaline obtenue à partir de RMN 2D, différente de la structure proposée par notre équipe. Ainsi, bien que les conclusions avancées quant aux interactions formées soient véridiques, il est fort probable que les résidus du récepteur impliqués dans ces liaisons intermoléculaires diffèrent.

Tous les résultats mentionnés précédemment ont d'ores et déjà apporté de précieuses informations sur la compréhension des paramètres autour de cet acide aminé pour l'affinité des ligands opioïdes. Néanmoins, une approche rationnelle mettant en jeu une plus grande diversité de fonctions chimiques est encore manquante. C'est donc avec cet objectif en tête que les travaux du présent chapitre ont été menés.

2.1.2 Approche rationnelle en suivant le diagramme de Topliss.

L'émergence du concept de relation structure-activité dans les années 1960, notamment grâce aux travaux de Hansch, a permis de rationaliser significativement l'optimisation de médicaments candidats par la quantification de modifications structurales à l'intérieur d'une série d'analogues (QSAR, *Quantitative Structure-Activity Relationship*).^{299–301} Ces méthodes reposent sur l'évaluation de plusieurs paramètres physico-chimiques des différentes modifications sur l'efficacité biologique. Les descripteurs les plus couramment utilisés sont la constante d'hydrophobicité π ,³⁰² représentant la contribution lipophile d'une fonction par rapport à l'hydrogène; la constante de substitution de Hammett σ ,³⁰³ symbolisant le caractère électrodonneur ou électroattracteur d'un groupe chimique (seulement en position *méta* et *para*, la contribution stérique étant trop importante pour la position *ortho*); ou le facteur stérique de Taft E_s ,^{304,305} calculé à partir de valeurs standards.

Toutes ces valeurs sont disponibles dans la littérature et peuvent être corrélées à l'activité d'une série d'analogues linéairement (**Équation 1a**), ou de façon parabolique (**Équation 1b**).^{306,307}

Équation 1.

$$\log(1/C) = K_1\pi + K_2\sigma + K_3Es + K_4 \quad (\text{a})$$

$$\log(1/C) = -K_1\pi^2 + K_2\pi + K_3\sigma + K_4Es + K_5 \quad (\text{b})$$

L'interprétation de telles données permet ensuite de prédire l'efficacité de modifications ultérieures. Bien qu'efficace, une telle approche nécessite hélas la synthèse de nombreux composés en amont afin d'avoir une base de données fiable. De plus la nécessité d'avoir recours à des méthodes mathématiques peut rebuter la plupart des chimistes et en limiter l'usage aux experts en QSAR.

Afin de remédier à ces limitations, Topliss a proposé en 1976, plusieurs méthodes reposant sur les mêmes concepts que précédemment, mais ne nécessitant pas l'usage de méthodes statistiques compliquées, les rendant ainsi accessibles à un plus grand nombre de chimistes médicaux.^{308,309} Une des plus répandues présentée à la **Figure 68**, est l'arbre décisionnel de Topliss. Cette approche, efficace lorsqu'un seul noyau aromatique doit être optimisé, s'est ensuite répandue dans de nombreuses campagnes d'optimisation au cours des cinquante dernières années, du fait de sa simplicité et du nombre relativement restreint de composés à synthétiser.

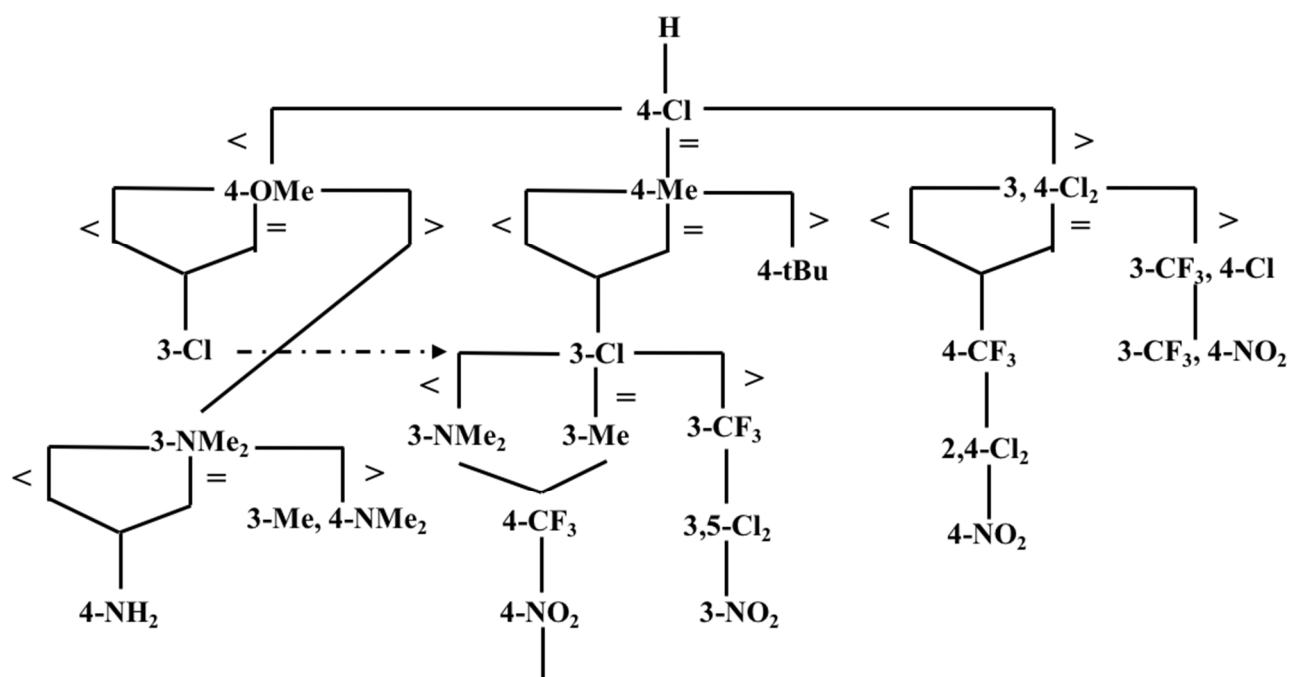


Figure 68. Arbre décisionnel de Topliss.

Dans un cas classique, l'analogue 4-Cl est d'abord synthétisé et comparé à l'activité du composé parent. Une efficacité améliorée traduit généralement une contribution positive de l'hydrophobicité ($+\pi$) ou de l'électronégativité ($+\sigma$) du groupement, ou bien une combinaison des deux. L'étape suivante est alors de passer au composé 3,4-Cl₂ où ces deux paramètres sont exacerbés, et devraient logiquement résulter en une efficacité augmentée (**Figure 69**).

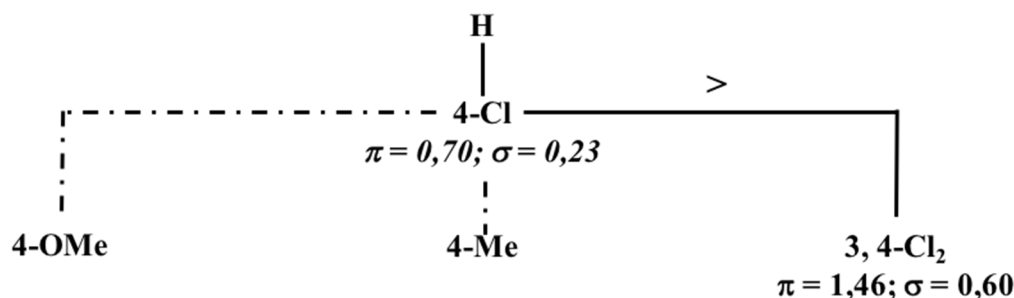


Figure 69. Décision lorsque l'activité du composé 4-Cl est supérieure à celle du composé parent.

Dans le cas où le composé 4-Cl posséderait une efficacité similaire au composé de départ (**Figure 70**), une influence lipophile bénéfique $+\pi$ contrebalancée par une influence néfaste de l'électronégativité ($+\sigma$) pourrait être mis en cause. Le remplacement de cette fonction par un méthyle dépourvu de caractère électroattracteur ($-\sigma$) devrait alors y remédier.

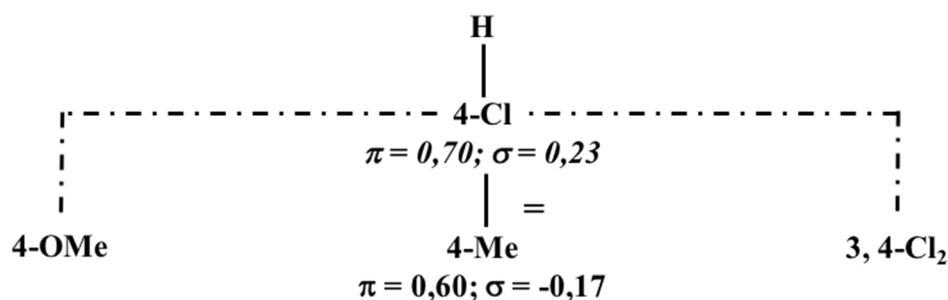


Figure 70. Décision lorsque l'activité du composé 4-Cl est similaire à celle du composé parent.

Dans le dernier cas de figure (**Figure 71**), une perte d'activité sur la molécule 4-Cl pourrait être provoquée par un encombrement stérique en position 4 ou un apport négatif $+\pi$ ou $+\sigma$. Dans l'hypothèse où ce phénomène serait essentiellement dû au caractère électroattracteur du chlore, la synthèse du composé 4-OMe électrodonneur ($-\sigma$) et légèrement hydrophile ($-\pi$), devient une solution envisageable.

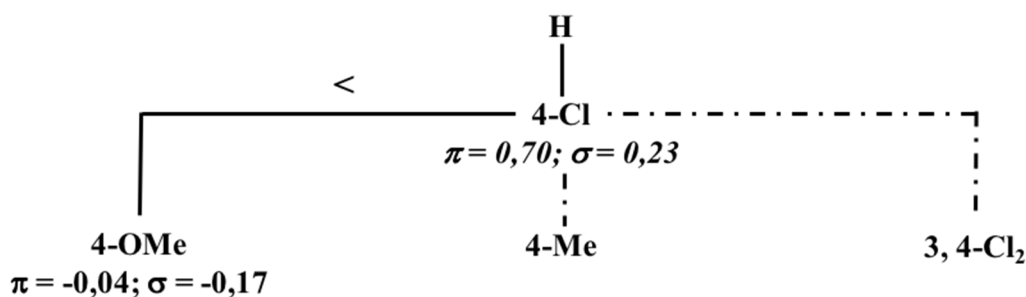


Figure 71. Décision lorsque l'activité du composé 4-Cl est inférieure à celle du composé parent.

En résumé, le cheminement de toutes ces étapes logiques permet au final d'obtenir un composé au profil pharmacodynamique optimisé. Il faut toutefois noter que les substitutions présentes dans le diagramme ne le sont qu'à titre guide à la réflexion, et qu'il est tout à fait possible de dévier de ce modèle si le besoin se présente.

2.2. Synthèse

De façon similaire au chapitre précédent, tous les peptides de ce chapitre ont été synthétisés sur phase solide (**Schéma 8**), en suivant une stratégie Fmoc, à partir d'acides aminés naturels ou modifiés commerciaux.

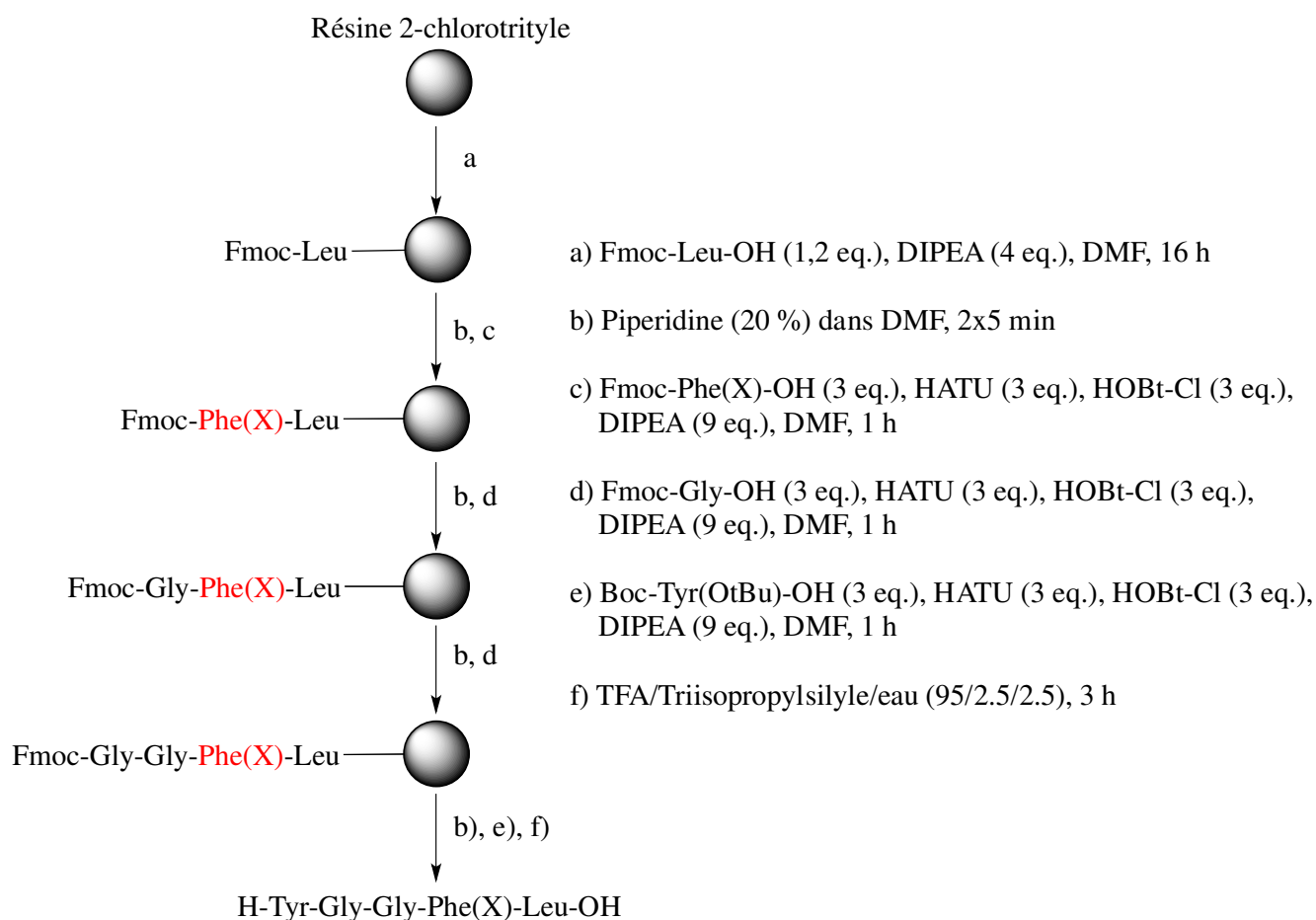
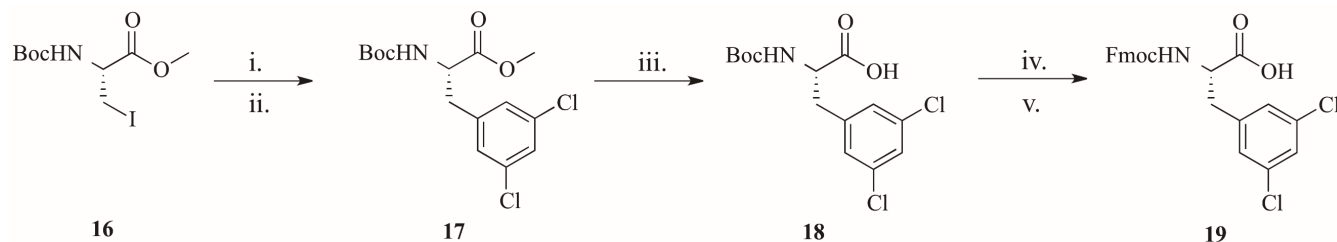


Schéma 8.

Au cours de notre exploration, nous avons eu besoin du composé Fmoc-Phe(3,5-Cl₂)-OH. Celui-ci n'étant pas disponible commercialement, il a donc été nécessaire de le synthétiser. Pour ce faire, nous sommes partis du résidu Boc-iodoalanine-OMe commercial, lequel a subi un couplage de Negishi en présence de 3,5-dichloro-iodophényle pour donner le Boc-Phe(3,5-Cl₂)-OMe avec un rendement acceptable. Dans un

second temps, l'estér a été hydrolysé en condition basique avant de déprotéger le groupe protecteur Boc en condition acide, et d'introduire le groupement protecteur Fmoc.



- i. Zn (1,27 eq.), I₂ (0,004 eq.), DMF, 30 min, RT; ii. 3,5-Cl₂PheI (0,99 eq.), Pd₂(dba)₂ (0,005 eq.), SPhos (0,02 eq.), DMF, 5h, 60 °C; 42 %
 iii. LiOH (3 eq.), THF/H₂O(6/2), 3h, RT; 88 %
 iv. TFA/DCM(5/5), 1h, RT; v. Fmoc-Cl (0.9 eq.), Na₂CO₃ (2.5 eq.), Dioxane/H₂O (5/5), TP, 16 h; 59 %

Schéma 9.

2.3. Discussion.

2.3.1 Propriétés pharmacodynamiques et progression selon l'arbre de Topliss (Figure 72)

Conformément au diagramme de Topliss, le composé 4-Cl (**22**), ainsi que ses trois ramifications (4-OMe; 4-Me; 3,5-Cl₂) ont d'abord été synthétisés. Leur affinité ainsi que leur efficacité biologique pour DOPr et MOPr (**Tableau 3**) ont ensuite été comparées à celles de la Leu-enképhaline pour le composé **22**, puis à celles de ce dernier pour les composés **23**, **24**, **25**. Le peptide 4-Cl (**22**) semble conserver une affinité pour DOPr moindre que celle du peptide parent, conformément aux valeurs obtenues par Rosa et al, bien qu'une activité biologique similaire soit observable.²⁹⁸ Concernant les trois autres peptides, les peptides **24** et **25** conservent une activité proche de celle du composé **22**, bien que le composé **24**, méthylé en position para, se démarque par une baisse d'affinité sur DOPr. Le composé **23** portant un 4-OMe est également caractérisé par une baisse tant au niveau de l'affinité que de l'activité. Tous les peptides mentionnés précédemment sont également accompagnés d'une meilleure sélectivité pour DOPr au niveau de l'activité, confirmant le rôle primordial de la position Phe⁴ dans la partie adresse de la Leu-enképhaline. Au vu des valeurs obtenues, la suite logique était de poursuivre avec le composé **26** sur lequel a été introduit un chlore en position *méto*.

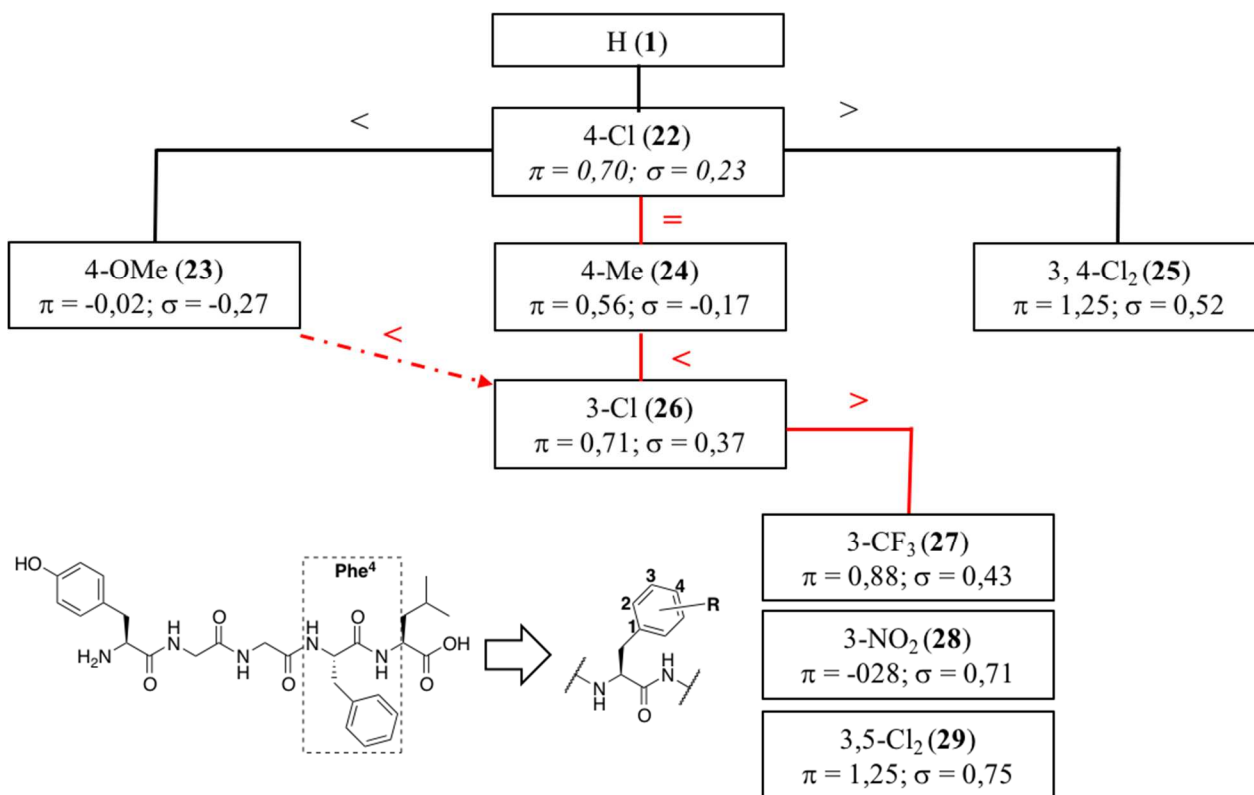


Figure 72. Première phase exploratoire.

Tableau 12. Affinité *in-vitro* des peptides 1, 22-29.

Entrée	Séquence	Ki ^a DOPr (nM)	Ki ^a MOPr (nM)	Sélectivité ^b	EC ₅₀ ^a DOPr EPAC (nM)	EC ₅₀ ^a MOPr EPAC (nM)	Sélectivité ^b
1	H	0,41 ± 0,08	0,31 ± 0,08	0,76	0,15 ± 0,02	0,89 ± 0,45	5,93
22	4-Cl	0,70 ± 0,31	0,23 ± 0,03	0,26	0,11 ± 0,05	23,9 ± 9,50	354
23	4-OMe	4,57 ± 1,07	0,54 ± 0,14	0,10	3,20 ± 2,50	111 ± 87,0	89,8
24	4-Me	11,6 ± 3,50	3,38 ± 1,96	0,29	0,11 ± 0,03	25,1 ± 9,02	228
25	3,4-Cl ₂	0,55 ± 0,09	0,68 ± 0,20	1,24	0,11 ± 0,03	4,50 ± 1,80	55,8
26	3-Cl	0,14 ± 0,03	0,02 ± 0,03	0,78	0,08 ± 0,04	3,89 ± 2,36	48,6
27	3-CF ₃	0,64 ± 0,06	0,14 ± 0,10	0,22	0,14 ± 0,05	9,82 ± 9,02	70,1
28	3-NO ₂	0,43 ± 0,05	0,32 ± 0,25	0,74	0,11 ± 0,00	11,8 ± 3,50	107
29	3,5-Cl ₂	0,45 ± 0,20	1,80 ± 0,05	4,50	0,04 ± 0,00	0,38 ± 9,02	9,50

^aLes valeurs de Ki ou d'EC₅₀ sont la moyenne de +/- S.E.M. de 3 à 5 expériences indépendantes. ^bLes valeurs de sélectivité sont calculées par le rapport Ki MOPr/Ki DOPr ou EC₅₀ MOPr/EC₅₀ DOPr .

A notre grand plaisir, une amélioration de l'affinité sélective à DOPr par un facteur 3 a pu être constatée. L' EC_{50} de **26** suit d'ailleurs la même tendance. L'exploration s'est donc poursuivie par la synthèse de la série de molécules **27**, **28**, **29**, portant respectivement un groupement 3- CF_3 , 3- NO_2 ou 3,5- Cl_2 . Aucune variation significative de l'affinité ou de l'efficacité, comparée à la Leu-enképhaline, n'a pu être observée, à l'exception du composé 3,5- Cl_2 (**29**), deux fois plus actif que le peptide **26**, mais non sélectif contrairement à ce dernier.

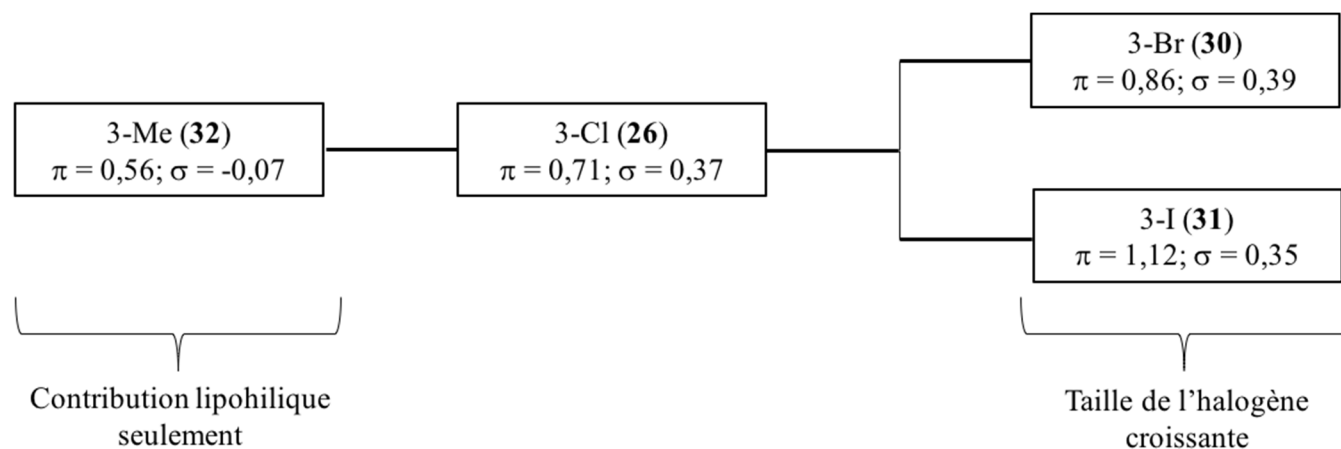


Figure 73. Étude complémentaire en position méta.

Encouragé par les bons résultats de **26**, nous avons désiré pousser plus loin l'investigation de la position méta (**Figure 73** ; **Tableau 13**). Pour cela, la taille de l'halogène a d'abord été progressivement augmentée sur les composés 3-Br (**30**) et 3-I (**31**). Dans un deuxième temps, le chlore a été remplacé par un méthyle purement lipophile, sur le peptide (**32**). Le composé 3-I (**31**) a quant à lui provoqué une diminution de la sélectivité en faveur de MOPr. Bien que conservant une activité similaire au composé **26**, la substitution en méta par un groupement méthyle sur le composé **32**, a engendré une baisse de l'affinité pour DOPr.

Tableau 13. Affinité *in-vitro* des peptides **26**, **30-32**.

Entrée	Séquence	Ki ^a DOPr (nM)	Ki ^a MOPr (nM)	Sélectivité ^b	EC ₅₀ ^a DOPr EPAC (nM)	EC ₅₀ ^a MOPr EPAC (nM)	Sélectivité ^b
26	3-Cl	0,14 ± 0,03	0,11 ± 0,39	0,78	0,08 ± 0,04	3,89 ± 2,36	48,6
30	3-Br	0,17 ± 0,08	0,23 ± 0,16	1,35	0,07 ± 0,01	0,65 ± 0,02	9,28
31	3-I	0,52 ± 0,11	0,20 ± 0,14	0,38	0,06 ± 0,02	0,31 ± 0,02	5,17
32	3-Me	1,51 ± 0,54	0,78 ± 0,54	0,52	0,06 ± 0,00	3,70 ± 0,02	61,7

^aLes valeurs de Ki ou d'EC₅₀ sont des moyennes de +/- S.E.M. de 3 à 5 expériences indépendantes. ^bLes valeurs de sélectivité sont calculées par le rapport Ki MOPr/Ki DOPr ou EC₅₀ MOPr/EC₅₀ DOPr .

Ainsi, au vu des valeurs des peptides **26-32**, la position *méta* de Phe⁴ semble tolérante à la plupart des modifications effectuées, qu'elles soient électroattractrices (**27**, **28**) ou lipophiliques (**32**). En revanche, l'introduction d'un halogène (**26**, **29-31**) a permis d'apporter un net bénéfice tant sur l'affinité que sur l'efficacité, laissant présager l'implication d'une liaison halogène.³¹⁰ Cet effet est toutefois tempéré au niveau de l'affinité lorsque l'halogène est un iode (**31**).

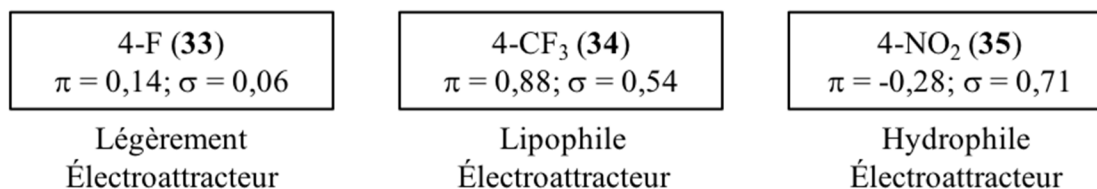


Figure 74. Exploration complémentaire en position para de Phe⁴

Afin de compléter notre étude, nous avons comparé les résultats obtenus avec plusieurs peptides actifs rapportés dans la littérature substitués en position para (**Figure 74**). Cette démarche est d'autant plus justifiée que les valeurs du composé 3,4-Cl₂ (**25**) ne sont pas suffisamment divergentes de **22**, pour que l'on ne prenne pas la peine de s'intéresser aux peptides appartenant à cette ramification de l'arbre de Topliss .

Tableau 14. Affinité *in-vitro* des peptides **33-35**.

Entrée	Substitution	Ki ^a DOPr (nM)	Ki ^a MOPr (nM)	Sélectivité ^b	EC ₅₀ ^a DOPr EPAC (nM)	EC ₅₀ ^a MOPr EPAC (nM)	Sélectivité ^b
33	4-F	0,52 ± 0,04	0,09 ± 0,06	0,17	0,07 ± 0,02	0,11 ± 0,02	1,57
34	4-CF ₃	0,60 ± 0,30	0,77 ± 0,10	1,28	0,06 ± 0,00	2,00 ± 0,02	33,3
35	4-NO ₂	1,45 ± 0,43	0,64 ± 0,11	0,44	0,08 ± 0,00	0,59 ± 0,02	7,37

^aLes valeurs de Ki ou d'EC₅₀ sont la moyenne de +/- S.E.M. de 3 à 5 expériences indépendantes. ^bLes valeurs de sélectivité sont calculées par le rapport Ki MOPr/Ki DOPr ou EC₅₀ MOPr/EC₅₀ DOPr .

Conformément aux résultats précédemment publiés, les composés 4-F (**33**) et 4-NO₂ (**35**) se sont révélés être plus actifs que la Leu-enképhaline.^{296,297} Ceci n'a pas été le cas pour le composé 4-CF₃ (**34**), sur lequel une perte d'efficacité avait été observée.

La compilation des valeurs pour **22-24** et **33-35** démontrent que DOPr peut accepter un groupement hydrophile (**35**) en position *para* de Phe⁴. En revanche un caractère électrodonneur trop prononcé semblerait être néfaste pour l'affinité, comme le témoigne le peptide 4-OMe (**23**) et le peptide 4-Me (**24**). Bien que la présence d'un chlore sur le peptide **22**, soit tolérée par le récepteur, sa taille pourrait être responsable de son gain limité. En effet, cela a pu être observé pour le composé 3,4-Cl₂ (**25**), où le bénéfice apporté par le chlore en *méta* a été tempéré par le deuxième chlore en *para*. Ainsi, le composé 4-F (**33**) est apparu comme le meilleur compromis entre taille, caractère électrodonneur et lipophilicité sur cette position du cycle aromatique. Cette observation est d'ailleurs en concordance avec les valeurs avancées par Rosa et al.²⁹⁸

Cette large gamme de modifications réalisées sur Phe⁴, nous a amené à l'hypothèse que le phényle pourrait être à même d'adopter plusieurs positions dépendamment de sa substitution et d'avoir une certaine marge de manœuvre dans sa « poche active ». Afin de vérifier cette théorie, un deuxième noyau phényle a été inséré en position β de la phénylalanine. Ce dernier devait alors couvrir un plus grand espace dans le récepteur.

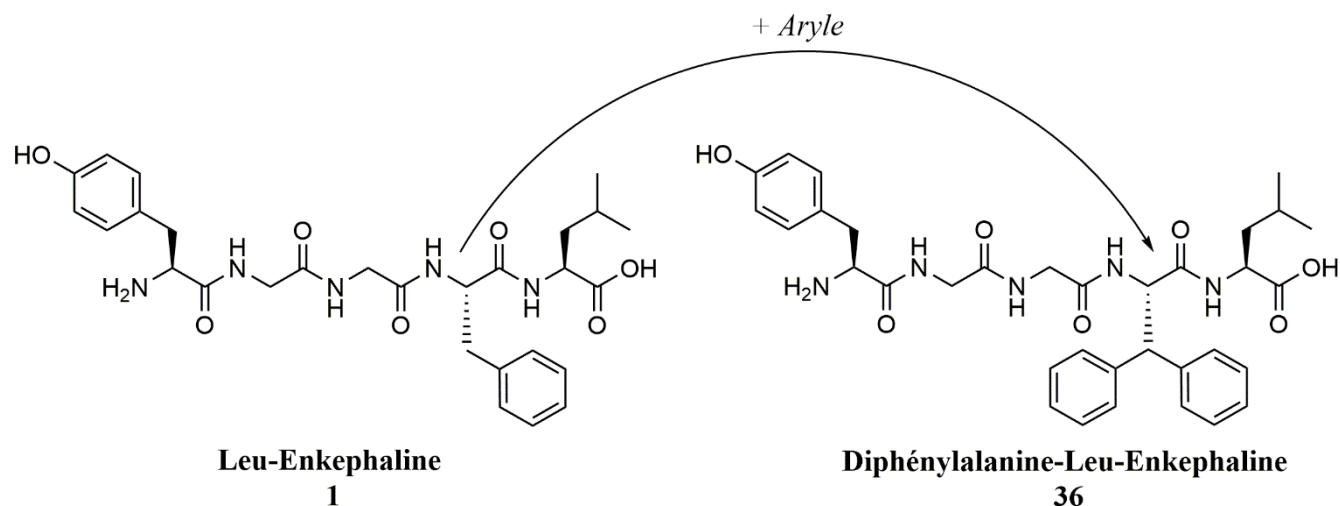


Figure 75. Insertion d'un deuxième noyau phényle en position β de la phénylalanine, afin de maximiser l'occupation du récepteur DOPr.

Malheureusement, cette modification n'a pas eu l'effet escompté. On a observé plutôt une absence de liaisons sur DOPr et MOPr (**Tableau 15**). Probablement que l'acide aminé est trop encombrant, pour permettre au peptide de se replier convenablement dans le récepteur.

Tableau 15. Affinité *in-vitro* du peptide **36**.

Entrée	Substitution	Ki ^a DOPr (nM)	Ki ^a MOPr (nM)	Sélectivité ^b
36	Di-Phe	617,5 \pm 1214	419 \pm 86,5	0,68

^aLes valeurs de Ki ou d'EC₅₀ sont la moyenne de \pm S.E.M. de 3 à 5 expériences indépendantes. ^bLes valeurs de sélectivité sont calculées par le rapport Ki MOPr/Ki DOPr ou EC₅₀ MOPr/EC₅₀ DOPr

Finalement, nous nous sommes intéressés au recrutement de la β -arrestine par les différents analogues synthétisés au cours de ce chapitre. La plupart des peptides ont des valeurs proches de celle de la Leu-enképhaline et suivent globalement la même tendance que pour le recrutement de la voie EPAC. Les composés 4-Me (**24**), 3-Me (**32**), 4-OMe (**23**), déjà caractérisés par une plus faible affinité et efficacité sur la voie AMPc, sont ceux qui recrutent le moins la β -arrestine. À l'inverse, les valeurs les plus fortes ont été obtenues pour les composés 4-F (**33**), 3-Cl (**26**), 3-Br (**30**) et 3-I (**31**) .

Tableau 16. Recrutement de la β -arrestine par les composés **1**, **22-35**.

Entrée	Substitution	EC ₅₀ ^a DOPr	EC ₅₀ ^a MOPr
		β -arrestine (nM)	β -arrestine (nM)
1	H	2,38 \pm 0,70	9,82 \pm 0,45
22	4-Cl	1,52 \pm 0,63	309 \pm 66,7
23	4-OMe	21,7 \pm 8,42	2206 \pm 1688
24	4-Me	11,8 \pm 9,02	1698 \pm 9,02
25	3,4-Cl ₂	1,63 \pm 1,05	67,2 \pm 45,4
26	3-Cl	0,42 \pm 0,11	28,7 \pm 9,19
27	3-CF ₃	1,59 \pm 0,57	182 \pm 41,5
28	3-NO ₂	1,00 \pm 0,31	113 \pm 35,8
29	3,5-Cl ₂	9,82 \pm 9,02	10,7 \pm 9,02
30	3-Br	0,57 \pm 0,17	43,9 \pm 19,7
31	3-I	0,34 \pm 9,02	23,4 \pm 9,02
32	3-Me	2,35 \pm 9,02	125 \pm 9,02
33	4-F	0,23 \pm 9,02	19,8 \pm 9,02
34	4-CF ₃	0,53 \pm 9,02	72,1 \pm 9,02
35	4-NO ₂	1,00 \pm 9,02	67,4 \pm 9,02

^aLes valeurs de Ki ou d'EC₅₀ sont la moyenne de +/- S.E.M. de 3 à 5 expériences indépendantes.

2.3.2. Modélisation moléculaire.

Afin de pouvoir rationaliser les résultats obtenus précédemment, chacune des molécules a été dockée à l'aide du logiciel MOE, dans le récepteur DOPr, en laissant libre les chaînes latérales du récepteur, dans un rayon de 15 Å.

Du fait de leurs valeurs intéressantes, la série des halogènes en position méta a été la première à subir cette phase de docking (**Figure 76 a, b, c**).

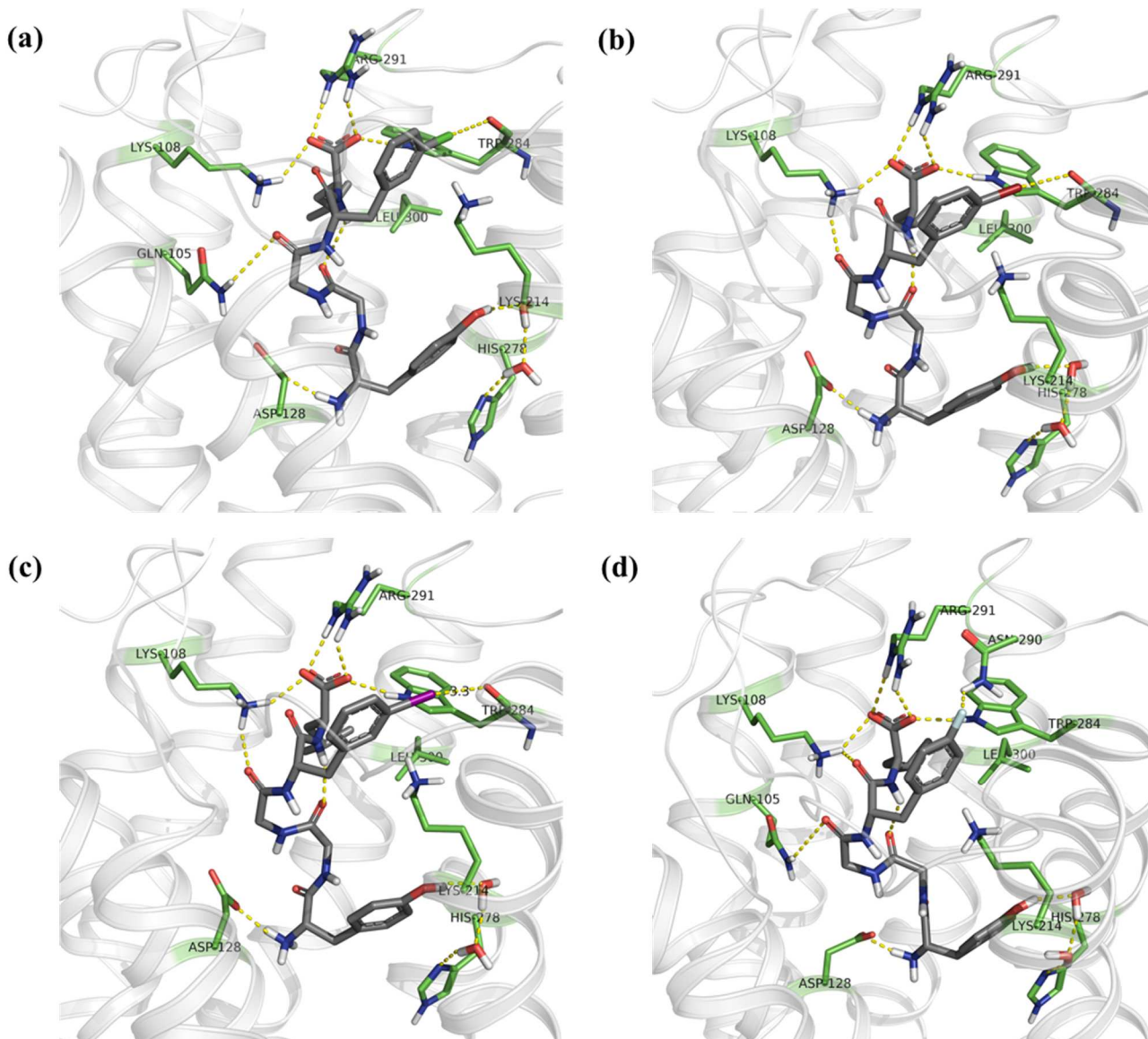


Figure 76. Docking induit dans le récepteur DOPr 4N6H des composés (a) 3-Cl (**26**), (b) 3-Br (**30**), (c) 3-I (**31**), (d) 4-F (**33**)

Il est alors apparu que les halogènes, à cette position, auraient la capacité de former une liaison halogène de type II (dans le prolongement de la liaison C-X, 180°), avec le carbonyle de l'amide de la chaîne principale de Trp284.³¹⁰ Cette observation est en accord avec la littérature où ce système est le plus fréquemment rencontré dans les biomolécules. Cette liaison est bénéfique tant pour l'affinité que l'activité biologique. Toutefois, la baisse d'affinité observée lorsque la taille de l'atome augmente, laisse supposer

que l'encombrement stérique pourrait venir contrebalancer cet effet. Cette remarque est appuyée par la mesure de la distance intermoléculaire halogène-CO et de l'angle O_{amide} -halogène- C_{sp^2} (**Tableau 17**).

Tableau 17. Paramètres géométriques.

Entrée	Substitution	D_{X-O} (Å)	r_{vdw} (Å) ³⁰⁹	Angle O-Hal-C (°)
26	3-Cl	3,30	3,27	168
30	3-Br	3,25	3,37	159
31	3-I	3,34	3,50	154

^aLes valeurs de distance et d'angle ont été mesurés grâce au logiciel MOE.

En effet, bien que les trois molécules possèdent une distance intermoléculaire avec le carbonyle proche de la somme des rayons de Van der Waals, l'iode et le brome plus volumineux engendrent une déviation plus importante de l'angle plan formé avec l'oxygène (idéalement, un angle de 170° pour ce type de liaison), et donc la formation d'une interaction moins efficace.^{310,311,312,313}

Concernant le composé 4-F (**33**) (**Figure 76d**), le fluor serait capable par l'intermédiaire de sa densité électronique négative, de former un pont salin avec Asn290.²⁹⁹

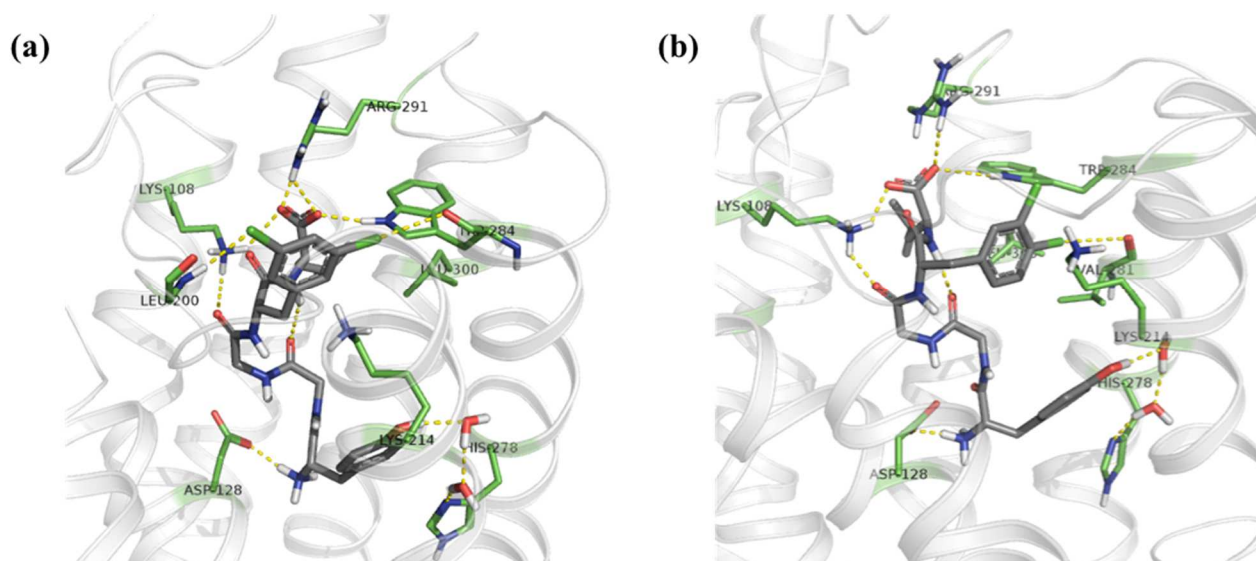


Figure 77. Docking induit (MOE) des composés (a) 3,5-Cl₂ (**29**) et (b) 3,4-Cl₂ (**25**), dans le récepteur DOPr 4N6H.

A l'instar du composé 3-Cl (**26**), l'analogue 3,5-Cl₂ (**29**) présenté en **Figure 77a** semble former une liaison halogène avec Trp284. Toutefois la présence du deuxième chlore pourrait produire une gêne stérique, malgré la possible interaction avec l'amide de Leu200. De la même façon, le composé 3,4-Cl₂ (**25**) pourrait former une faible interaction avec Val281.

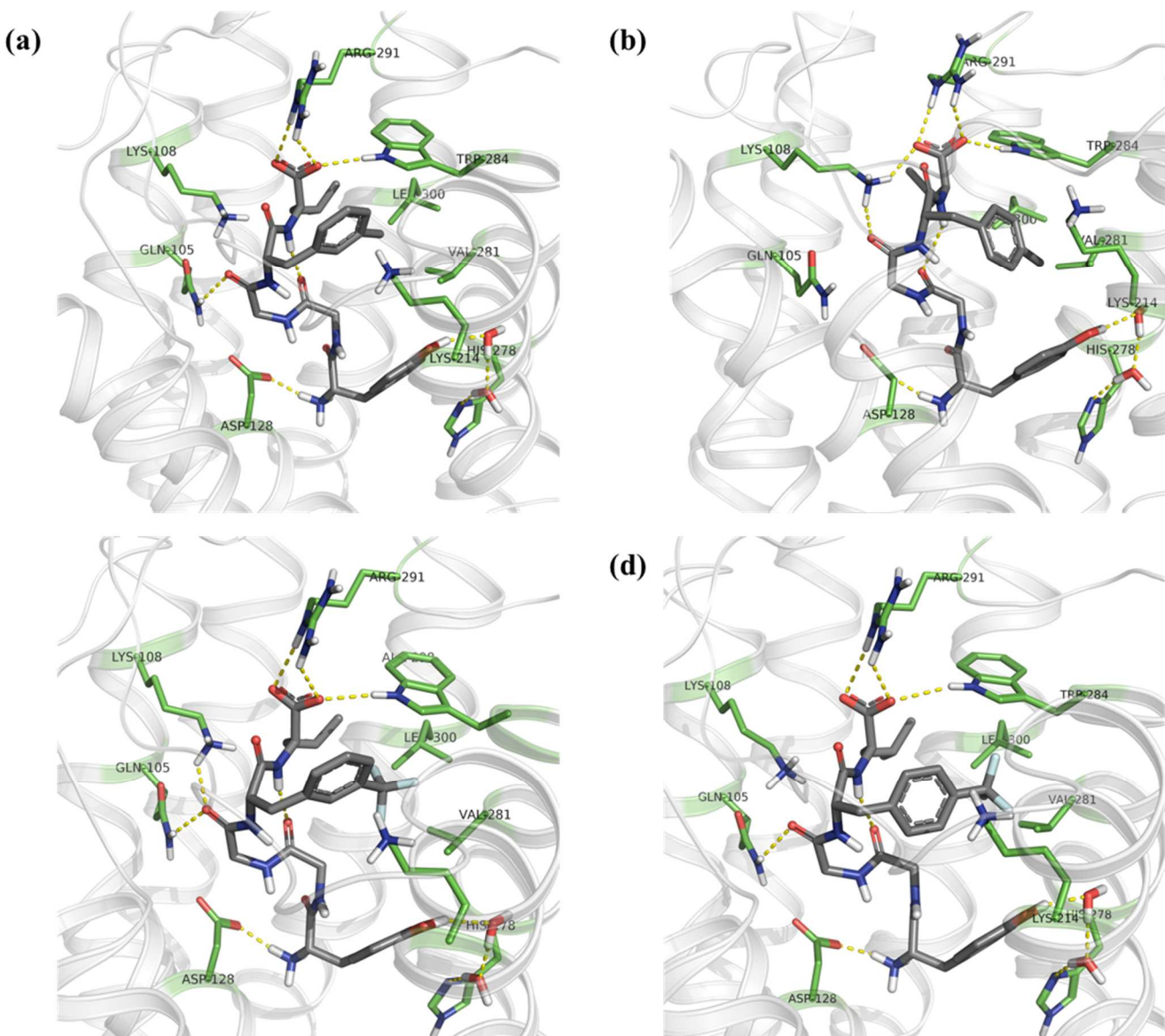


Figure 78. Docking induit (MOE) des composés (a) 3-Me (**32**), (b) 4-Me (**24**), (c) 3-CF₃ (**27**) et (d) 4-CF₃ (**34**), dans le récepteur DOPr 4N6H.

L'insertion d'un méthyle sur le résidu Phe⁴ semble influencer l'orientation du phényle de manière à ce que le CH₃ pointe vers la poche hydrophobe constituée de Leu300 et de Val281, créant un encombrement

stérique pouvant expliquer la baisse d'affinité du peptide **24** sur DOPr. Afin d'effectuer cette même orientation, le composé 3-Me (**32**) nécessite de positionner sa chaîne latérale plus haut dans le récepteur, résultant en une gêne stérique moindre et donc une meilleure affinité. Le même phénomène semble se produire pour les peptides 3-CF₃ (**27**) et 4-CF₃ (**34**).

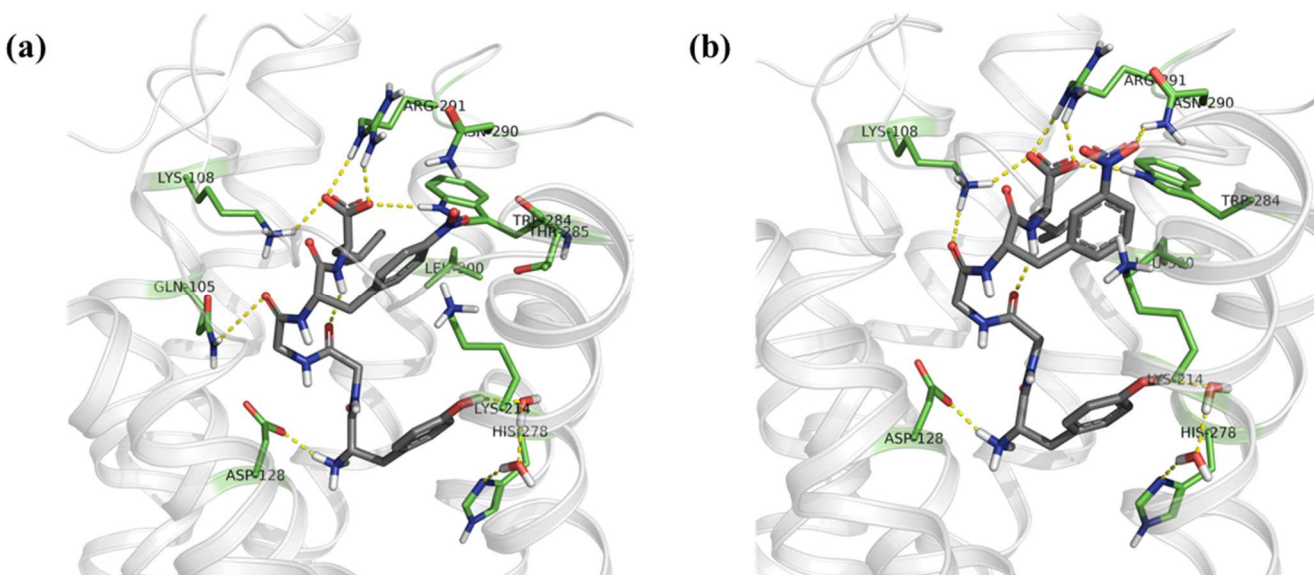


Figure 79. Docking induit (MOE) des composés (a) 4-NO₂ (**35**), (b) 3-NO₂ (**28**), dans le récepteur DOPr 4N6H.

L'inclusion d'un groupement hydrophile tel qu'un nitro en position *mé*ta (**35**) (**Figure 79b**) ou *para* (**28**) (**Figure 79a**), positionne le cycle aromatique dans la partie haute du récepteur de façon à diriger le nitro dans une poche hydrophile constitué de Asn290, Trp284 et Thr285.

Dans le cas du composé 4-OMe (**23**) (**Figure 80b**), le méthyle semble être dirigé vers Leu300, occasionnant éventuellement une gêne stérique, expliquant ainsi l'efficacité moindre de cette molécule et la plus grande sélectivité observée (la leucine étant remplacée par un tryptophane dans le cas du récepteur MOPr). Le composé 4-Cl (**22**) (**Figure 80a**) quant à lui, pourrait former une interaction avec le carbonyle de Val281.

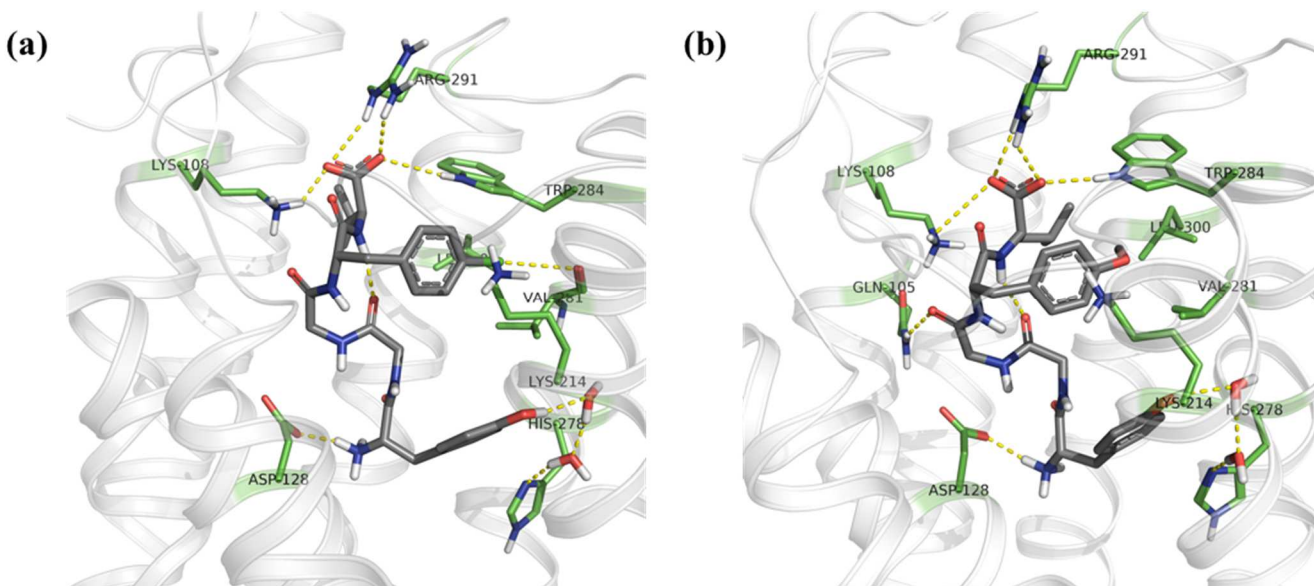


Figure 80. Docking induit (MOE) des composés (a) 4-Cl (**22**), (b) 4-OMe (**23**), dans le récepteur DOPr 4N6H.

La superposition des différents analogues en **Figure 81** démontre ainsi une forte mobilité du noyau aromatique de Phe⁴, qui s'arrange selon trois positions: haute, médiane et basse. Une différence de 6 Å (entre les atomes de carbone des positions *para* des chaînes latérales de Phe⁴) a pu être observée entre le composé 3-Br (**30**) occupant la position la plus haute et le composé 4-Me (**24**) occupant la position la plus basse.

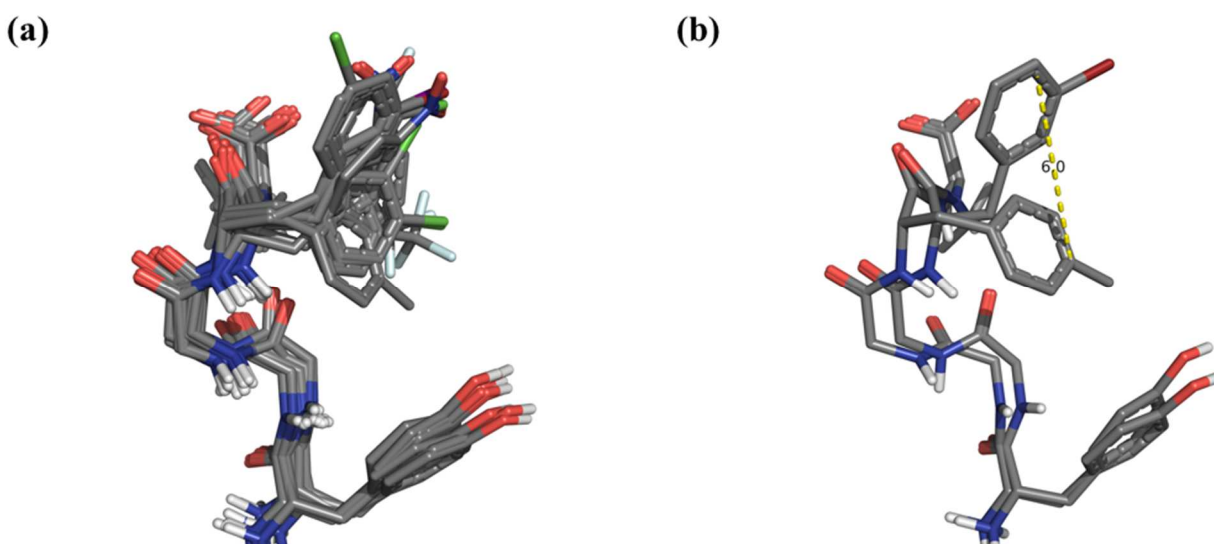


Figure 81. Superposition des peptides **1**, **22-35** (a) et des peptides **24** et **30** (b).

Il est également intéressant de constater que la sélectivité semble suivre le positionnement du phényle. En effet, les composés situés en haut du récepteur subissant moins de gêne stérique, sont moins sélectifs que ceux positionnés vers le bas, plus proches des résidus mutés sur MOPr. À la lumière de ces informations, il nous semble raisonnable d'avancer que Phe⁴ dans le cas de la Leu-enképhaline, devrait adopter une position proche de celle rencontrée dans le composé 4-F (**33**).

2.3.3. Propriétés pharmacocinétiques.

Les propriétés pharmacodynamiques des différents analogues ayant été déterminées, nous nous sommes finalement intéressés à leurs propriétés physico-chimiques. Pour cela, les quatre meilleurs composés ont été sélectionnés pour des études complémentaires.

Tableau 18. Paramètres physico-chimiques calculés et mesurés des peptides **1**, **26**, **30**, **31** et **33**.

Entrée	Séquence	logD _{7.4}	Δ logD ^b	clogD ^a	Δ clogD ^b	tPSA ^a (Å ²)	LLE ^b
1	H	-1,37	0	-1,86	0	204,4	11,2
26	3-Cl	-0,03	1,34	-1,26	0,6	204,4	10,12
30	3-Br	0,14	1,51	-1,10	0,76	204,4	10,95
31	3-I	0,34	1,71	-0,94	0,92	204,4	9,88
33	4-F	-0,88	0,49	-1,72	0,14	204,4	11,03

^aLes valeurs de clogD et de tPSA ont été calculées par la suite logicielle ChemAxon. ^b Δ logD = logD_{composé1}-logD_{analogue} ^cLLE : Efficacité Lipophile d'un Ligand calculée par la formule LLE = pEC₅₀ - logD_{7.4}.

Comme il était possible de l'envisager, la lipophilicité des molécules a augmenté avec la taille croissante des halogènes, tandis que le fluor n'a apporté qu'une amélioration plus modeste. Encore une fois, les logD calculés sont éloignés des valeurs mesurées, ils suivent toutefois la même tendance. Les calculs des tPSA ne nous ont pas fournis de résultats particuliers. En effet, il semblerait que les différents halogènes possèdent la même contribution pour cette mesure. Pour ce qui est des efficacités lipophiles des ligands (LLE), les valeurs proches de celle de la Leu-enképhaline suggèrent que les EC₅₀ augmentées sont

effectivement reliées à une réelle contribution favorable des halogènes sur le mode de liaison des analogues avec le récepteur.

2.4 Conclusions et perspectives.

Ainsi, en s'aidant de l'arbre décisionnel de Topliss, plusieurs peptides portant divers substituants sur l'acide aminé Phe⁴ ont été synthétisés, afin d'optimiser la Leu-enképhaline, mais aussi de tenter de mieux comprendre le comportement de cette chaîne latérale.

La mesure de l'affinité ainsi que l'efficacité du recrutement de la voie de signalisation AMPc (EPAC) sur les récepteur MOPr et DOPr, nous ont ensuite indiqué que la fonctionnalisation de cette position était relativement tolérante, avec des valeurs proches de celles du peptide parent, suggérant que la marge de manœuvre du noyau aryle dans le récepteur était suffisamment large. Les meilleurs résultats ont été obtenus pour la série comprenant un halogène en position *méta* de la phénylalanine, avec le meilleur compromis entre affinité et efficacité obtenu pour le composé 3-Cl (**26**) et 3-Br (**30**). En effet, bien que la molécule 3-I (**31**) possède un bon EC₅₀, son affinité sur les récepteurs baisse, probablement à cause d'un encombrement stérique.

Dans le but de fournir une explication aux résultats obtenus précédemment, tous les composés ont été modélisés dans le récepteur DOPr par docking induit avec le programme MOE, qui permet aux chaînes latérales de bouger dans un rayon de 15 Å, autour du ligand. Comme nous l'avions supposé, les composés **27**, **30** et **31**, portant un halogène en position *méta*, semblent former une liaison halogène avec le carbonyle de Trp284. Cette liaison semble toutefois moins efficace dans le cas du composé 3-I (**31**). Le peptide 4-F (**33**) qui s'était révélé être également efficace, pourrait former quant à lui un pont salin avec Asn285. Lorsqu'un groupement lipophile a été introduit (composés **23**, **24**, **32**), le noyau aromatique semble se diriger vers le bas ou le milieu du récepteur afin de positionner ce dernier vers une poche hydrophobe constitué de Leu300 et Val281. Les composés portant un groupement hydrophile (3-NO₂ (**28**), 4-NO₂ (**35**)), préfèrent quant à eux adopter une position haute afin de placer le substituant dans une poche hydrophile. Il est intéressant de noter que le positionnement de Phe⁴ semble suivre la sélectivité. En effet, une position basse du phényle est reliée à une plus grande sélectivité, conformément aux hypothèses avancées dans la littérature.²⁵⁴

En plus d'augmenter significativement les propriétés pharmacodynamiques, l'ajout d'halogène a été accompagné d'une amélioration du logD (jusqu'à un gain de 1,71). Ainsi il serait intéressant de combiner cette modification avec celles précédemment obtenues au chapitre 1, à l'exemple du composé **37** présenté en **Figure 82**. Dans l'hypothèse où le gain apporté par l'halogène serait additif ou synergique avec les modifications discutées plus tôt, une telle molécule pourrait dépasser un logD de 2 et éventuellement passer la BHE.

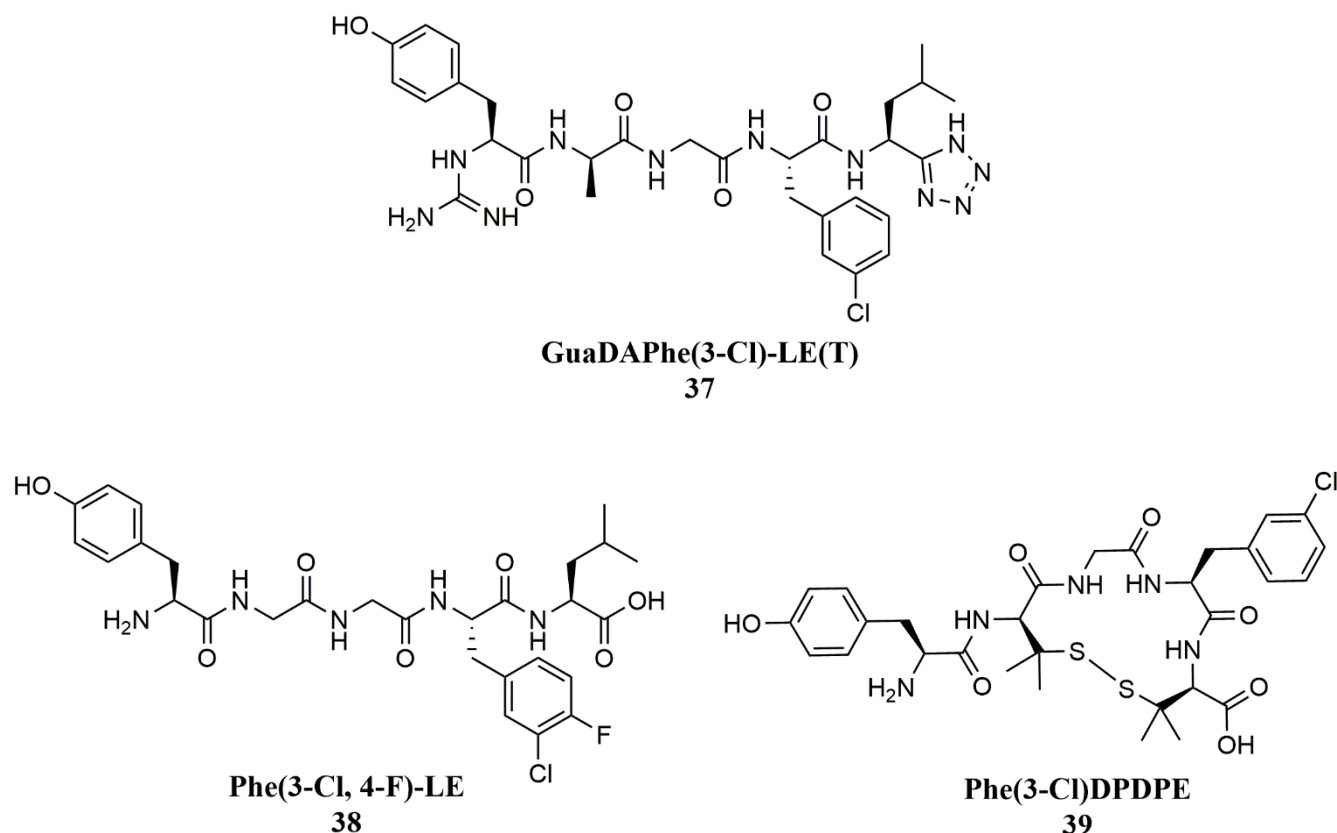


Figure 82. Structure chimique des composés **37-39**.

Le cycle aromatique se situant à peu près dans la même zone du récepteur pour les composés 4-F (**33**) et 3-Cl (**26**), la combinaison de ces deux halogènes sur une seule molécule (**38**) pourraient être intéressante. En effet, au vu de sa petite taille, le Fluor ne devrait pas engendrer de gêne stérique (**Figure 83a**), et par son caractère électronégatif serait capable d'augmenter la lacune électronique du chlore et ainsi renforcer la liaison halogène formé par ce dernier avec le récepteur.

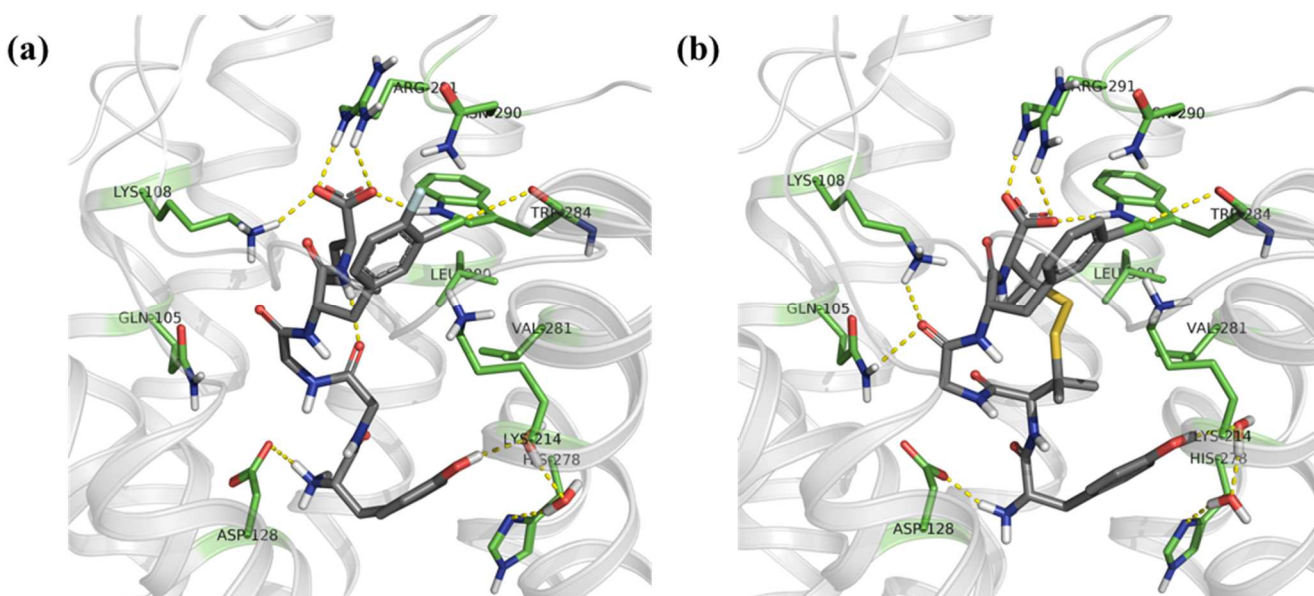


Figure 83. Docking induit (MOE) des composés (a) **38**, (b) **39**, dans le récepteur DOPr 4N6H.

Comme il l'a été mentionné lors de l'introduction, l'insertion d'un halogène en position para de Phe⁴ sur le macrocycle DPDPE est déjà connue pour augmenter tant l'affinité que la sélectivité sur DOPr.³¹⁴ Cependant, le docking présenté en **Figure 83b** suggère que l'interaction formée par le peptide linéaire pourrait également être reproduite par le macrocycle, combinant ainsi les bonnes propriétés pharmacodynamiques et pharmacocinétiques inhérentes aux macrocycles.

CHAPITRE 3 : DÉVELOPPEMENT ET CARACTÉRISATIONS D'ANALOGUES MACROCYCLIQUES DE LA LEU-ENKÉPHALINE.

3.1 Introduction

La macrocyclisation constitue une autre méthodologie fiable et reconnue d'améliorer de façon conséquente les propriétés pharmacocinétiques d'une molécule souffrant d'un mauvais profil médicamenteux.²³² Cette approche a entre autres été grandement utilisée dans le domaine de la chimie peptidique. Elle permet ainsi de s'affranchir des règles de Lipinski (règles empiriques permettant de prévoir la capacité d'une molécule à un être un bon candidat médicament : Masse moléculaire < 500 Da ; NbDonneurs liaisons H < 5 ; NbAccepteurs liaison H < 10 ; LogP < 5) peu applicables aux peptides, qu'ils soient ou non cycliques. En effet, la présence de nombreuses fonctions amides viole *de facto* le nombre de fonctions donneuses et acceptrices de liaisons H permises.^{290,315} En effet, la surface de solvant accessible, propriété physico-chimique corolaire de ces règles de Lipinski, va se trouver être fortement diminuée après macrocyclisation, (Figure 84).³¹⁶

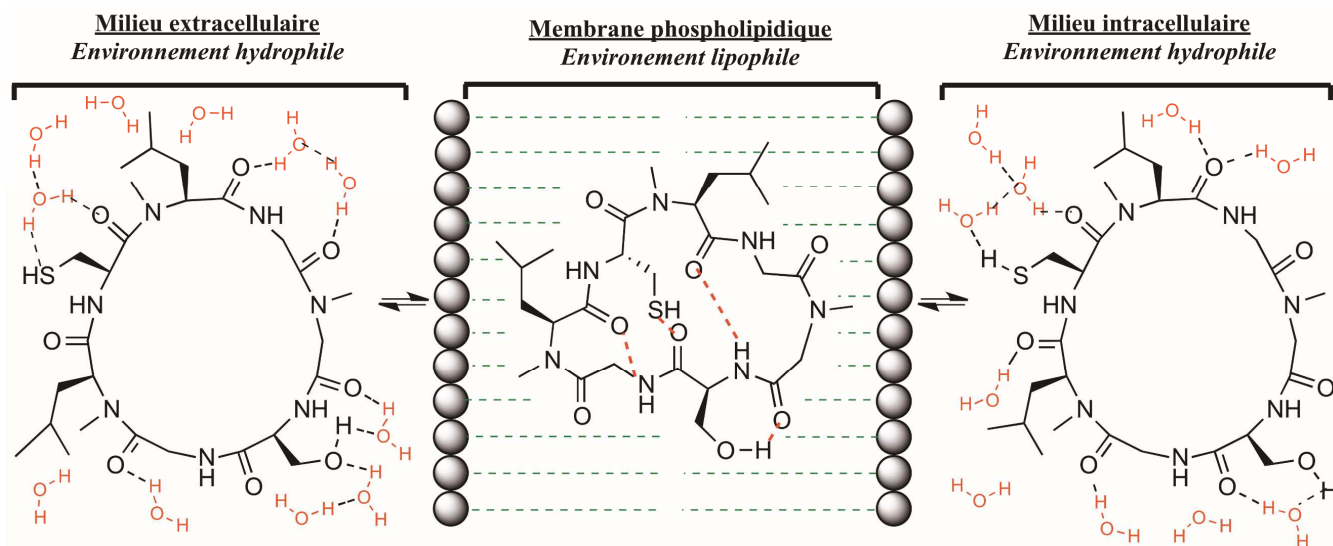


Figure 84. Changement conformationnel d'un macrocycle lorsqu'il passe d'un milieu aqueux à un milieu lipophile

Pour cela, le macrocycle va adopter un comportement « caméléon » dépendamment de son environnement (**Figure 84**).³¹⁷ Tandis qu'en milieu aqueux, les groupements polaires vont être exposés

afin d'interagir avec les molécules d'eau, en milieu lipophile, le macrocycle va modifier sa conformation afin de masquer ces mêmes fonctions hydrophiles, soit par liaisons H intramoléculaires ou transannulaires.

En plus de cet aspect, la rigidité induite par la macrocyclisation empêche les macrocycles d'adopter une conformation linéaire normalement exigée par les protéases, et améliore ainsi grandement la stabilité plasmatique (bien que quelquefois ces résultats améliorés soient plutôt associés à de meilleurs propriétés pharmacodynamiques, qu'à une réelle stabilité augmentée) .³¹⁸ Cependant, dans le cas de macrocycles plus larges, telle que la cyclosporine, la plus grande flexibilité du cycle diminue cette inhibition de la dégradation, en favorisant la reconnaissance des sites de clivages par ces enzymes.

Outre ces aspects pharmacocinétiques, ces molécules, si elles sont bloquées dans une conformation adéquate, peuvent voir leur affinité améliorée. Ce dernier point trouve d'autant plus son intérêt dans le domaine des RCPG. En effet, chaque molécule induit un complexe ligand-récepteur différent, et donc une confirmation du RCPG distincte. Chacune de ces conformations est reliée à son propre profil d'activation de voies signalétiques. De ce fait, il est possible de discriminer les voies signalétiques non désirées, au profit de celles possédant un intérêt thérapeutique. Ainsi, un macrocycle bloqué dans une conformation bloquant les signaux de la douleur, sans recruter la β -arrestine serait d'un grand intérêt dans le cadre de notre projet.

3.1.1. Stratégies de macrocyclisation.

Plusieurs tactiques sont à la disposition des chimistes lorsqu'il s'agit de cycliser des peptides actifs (**Figure 85**).

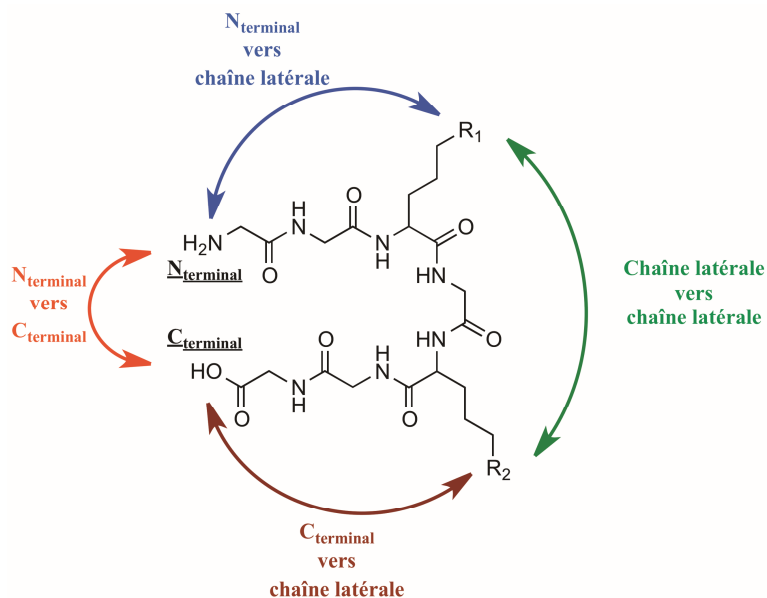


Figure 85. Stratégies de macrocyclisation utilisées en chimie médicinale.

La première consiste à relier les deux extrémités du peptide entre elles. Elle est généralement la technique la plus utilisée en chimie médicinale, car elle est effectuée facilement par lactamisation et permet de s'affranchir des deux groupements carboxylates et ammonium hautement polaires. Malheureusement, celle-ci ne peut être appliquée à notre projet, au risque de perdre l'affinité ou l'activité biologique. La deuxième approche est de relier une des extrémités (N-terminal ou C-terminal) avec une chaîne latérale. Finalement, le ligand peut être cyclisé entre deux de ses chaînes latérales. C'est la stratégie la plus fréquente dans le domaine des peptides opioïdes. Par exemple, un des acides aminés de la séquence initiale peut être remplacé par un acide aminé possédant une fonction amine en chaîne latérale (par taille croissante : acide 2,4-diaminopropionique, Dap ; acide 2,4-diaminobutanoïque Dab ; ornithine, Orn ; Lysine), tandis qu'un autre acide aminé possédant un résidu acide carboxylique est inséré (acide aspartique, Asp; acide glutamique, Glu), afin de procéder à la cyclisation par formation d'amides (**Figure 86, a**). De façon similaire, un pont urée est parfois considéré. Le macrocycle peut également être établi par la formation d'un pont disulfure entre deux résidus soufrés (cystéine, pénicillamine), (**Figure 86, b**).

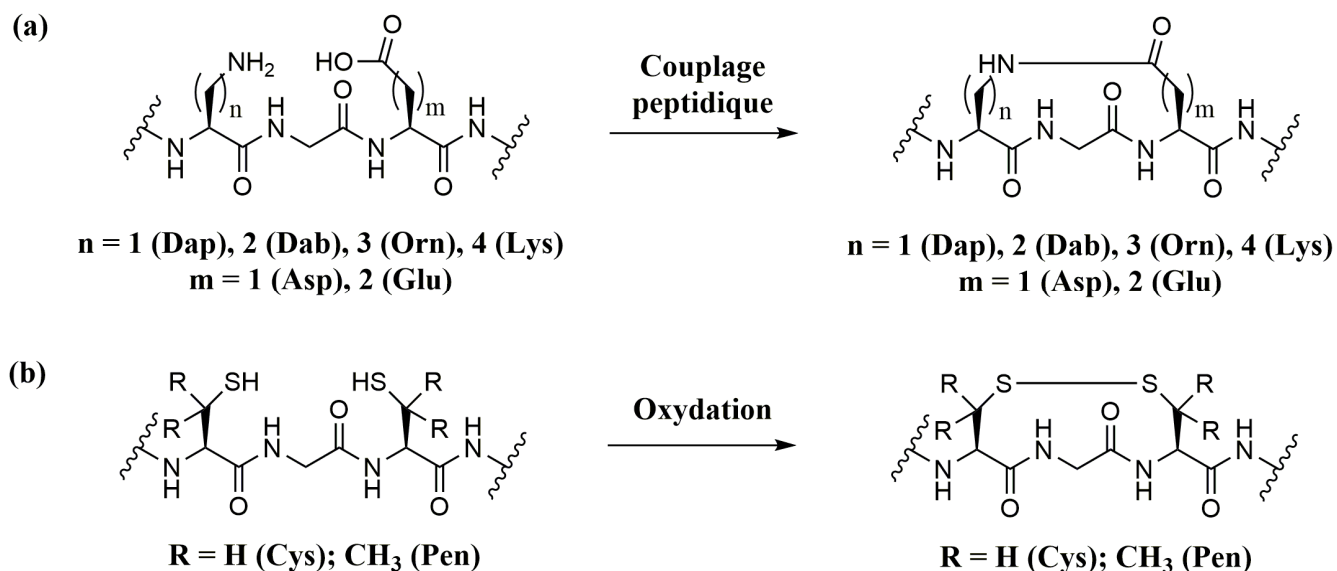


Figure 86. (a) Acides aminés utilisés pour la macrolactamisation. (b) Acides aminés pour la cyclisation via un pont disulfures.

3.1.2. Analogues macrocycliques de peptides opioïdrgiques dans la littérature.

Comme mentionné plusieurs fois au cours de cet ouvrage, l'amine terminale est essentielle pour l'affinité ou l'activité biologique. En effet, la plupart des macrocycles où celle-ci est impliquée dans la formation du cycle ont été accompagnés d'une baisse d'efficacité, voire d'une conversion en antagoniste.^{319,320,321} Dans le cas présenté ci-dessous, un dérivé de dynorphine a été cyclisé directement entre l'amine terminale et l'acide glutamique en position 5 (**Figure 87a**), avec pour résultat sa conversion en antagoniste.³²² L'ajout d'un pont acétate ($N-CH_2-CO-$) entre l'amine et la lysine du composé en **Figure 87b**, afin de sauvegarder le caractère cationique de cette amine, a diminué l'affinité pour les trois récepteurs MOPr, DOPr et KOPr.³²³

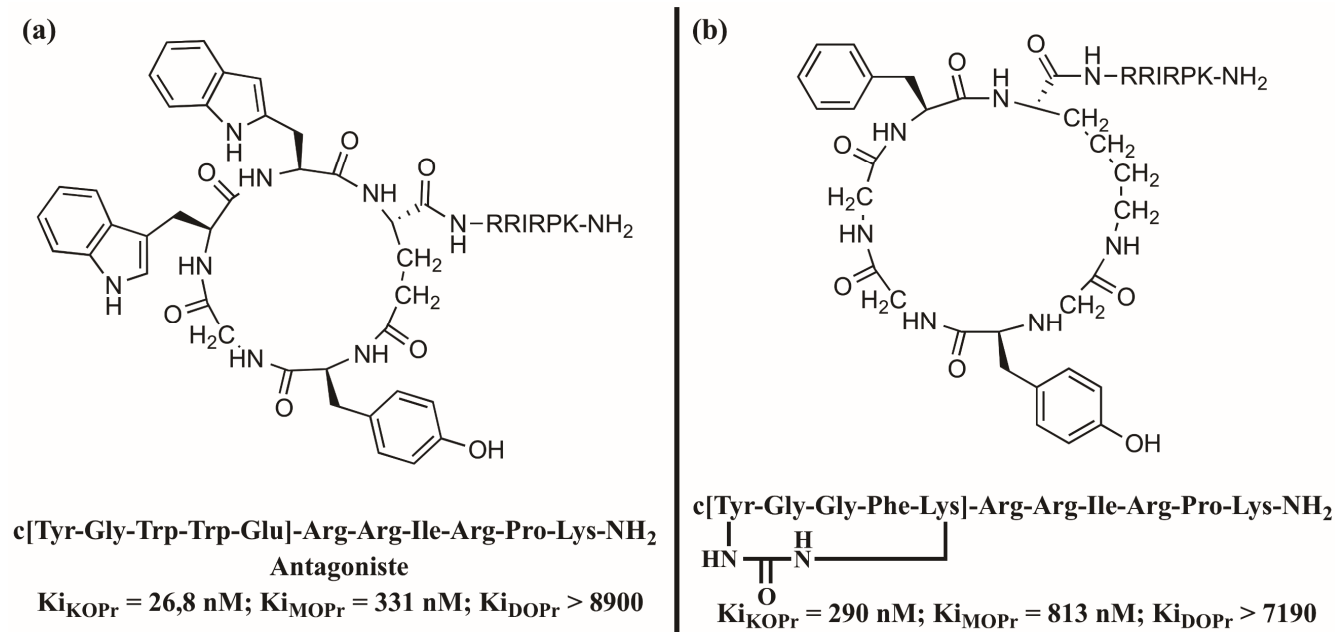


Figure 87. Structures chimiques d'analogues cycliques de la Dynorphine en *N*-terminal, (a) directement entre l'amine de Tyr et l'acide glutamique, ou (b) entre l'amine de Tyr et la lysine à l'aide d'un espaceur acétate (N-CH₂-CO-).

Cependant, une nouvelle classe de macrocycles développée par l'équipe du professeur Gentilucci permet de conserver l'activité, tout en cyclisant en position N-terminale. En effet, au cours d'une campagne de SAR autour de l'endomorphine cyclique c(Tyr-Pro-Trp-Phe-Gly), où chacun des résidus a été substitué systématiquement par son stéréoisomère L ou D, l'analogue c(Tyr-D-Pro-D-Trp-Phe-Gly) (**Figure 88a**) s'est démarqué avec une affinité acceptable (34 nM) comparée aux autres analogues de la série (> 1 μM).³²⁴ Des travaux de modélisation supplémentaires ont révélé que le remplacement du noyau phénol de la tyrosine par un noyau indole d'un tryptophane, permettrait de conserver l'interaction clé avec Asp196, tout en cyclisant en N-terminal.³²⁵ En utilisant cette stratégie, les auteurs ont, non seulement conservé une bonne activité biologique, mais ils ont été aussi capables de moduler l'affinité pour les trois récepteurs opioïdes en variant la taille des tetrapeptides, et de la nature des résidus utilisés (**Figure 88b**).²²⁹

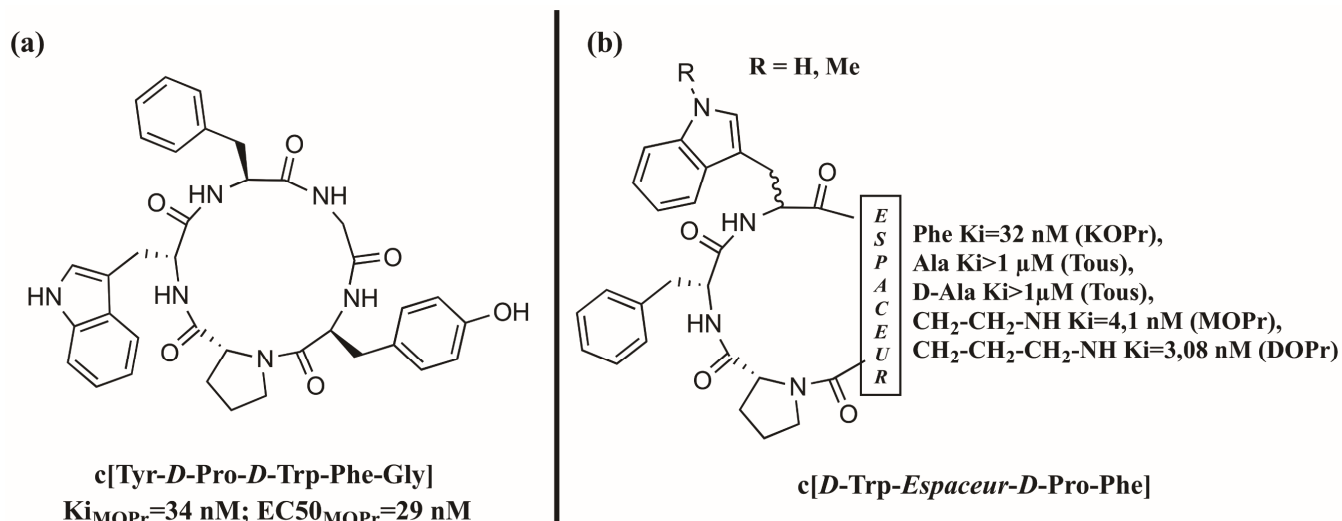


Figure 88. Structures chimiques de composés macrocycliques dérivés de l'endomorphine et dépourvus de sites cationisables (a). La modification de la nature et/ou de la taille de l'espaceur permet de moduler l'affinité pour les différents récepteurs opioïdes

La fermeture de cycle par le carboxylate en position terminale a produit des résultats plus divers. Une augmentation de l'efficacité a été observée dans le cas d'analogues sélectifs à MOPr, tels que la casomorphine ou la morphiceptine (**Figure 89a**).^{326,327} Appliquée sur le squelette de la Leu-enképhaline, cette stratégie a converti l'agoniste DOPr en agoniste MOPr. L'ordre de grandeur de ce revirement augmente avec la taille du résidu aminé utilisé en position 2 (d'un ordre de 10 fois pour l'ornithine et d'un ordre de 29 fois pour la lysine) (**Figure 89b**).³²⁸

En revanche, lorsque la cyclisation est effectuée entre deux chaînes latérales de la Leu-enképhaline entre une D-Lysine en position 2 et un acide glutamique en position 5, l'affinité sur DOPr est conservée, bien qu'elle soit accompagnée d'une baisse de la sélectivité comparée au peptide parent (deux fois moins) (**Figure 90a**).^{329,330}

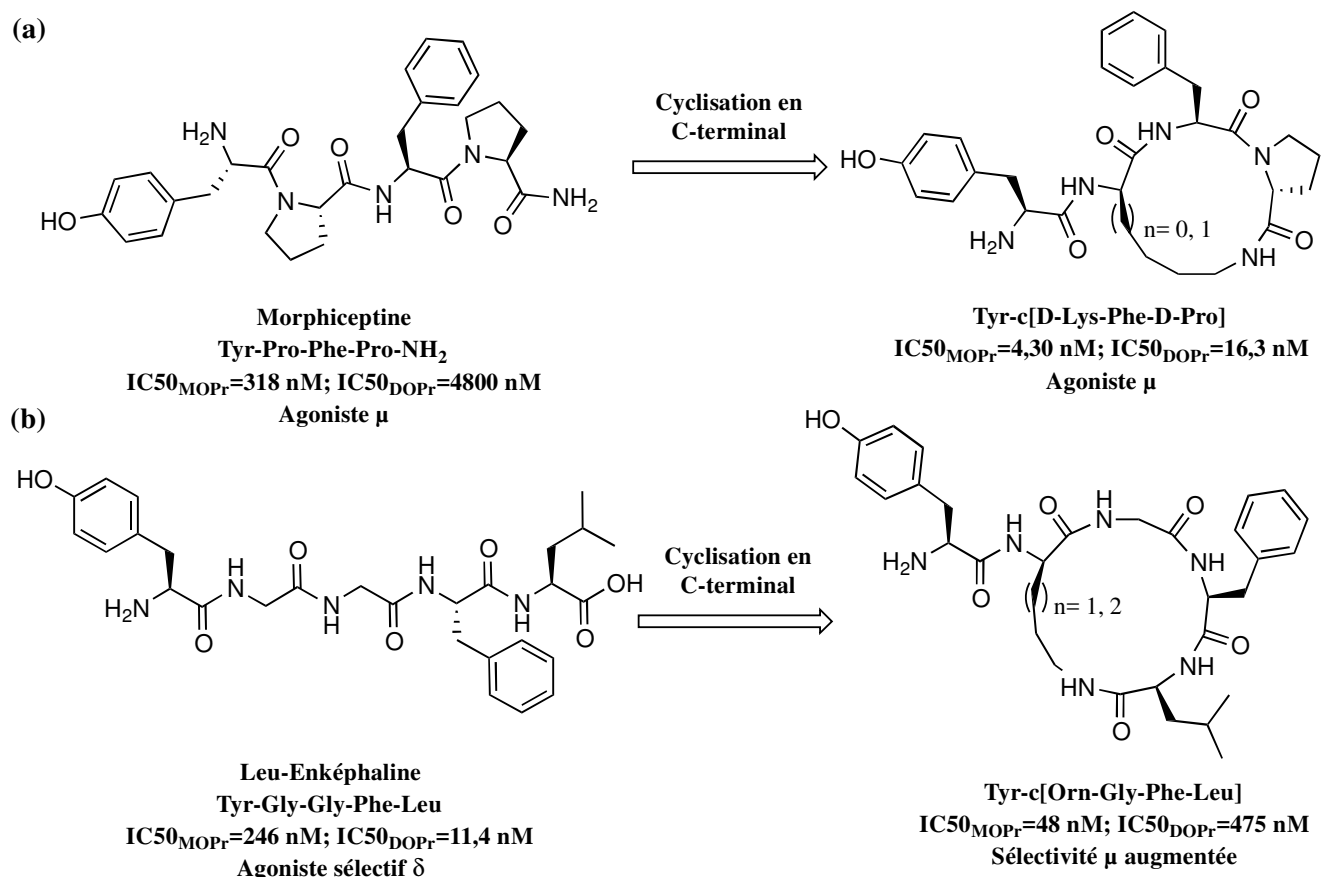


Figure 89. (a) La cyclisation en C-terminal de la morphiceptine renforce la sélectivité pour MOPr, (b) tandis qu'elle convertit la Leu-Enképhaline en agoniste DOPr.

Une approche similaire a été mise en œuvre sur des dérivés d'endomorphines de séquence Tyr-c(D-Lys/Orn-Phe-Glu/Asp)-NH₂ (**Figure 90b**).³³¹ Encore une fois, une augmentation de la sélectivité pour MOPr a été constatée (3 fois plus sélectif à MOPr), malgré une hausse de l'affinité pour DOPr lorsque la taille du cycle augmente (de 2200 nM à 4,36 nM). L'équipe de Janecka a également effectué une étude extensive de structures-activités autour d'analogues d'endomorphines. Dans ces composés, différents acides aminés L ou D, de taille croissante ont été introduit de façon systématique, en position 2 et 5. Le meilleur résultat a été obtenu pour le composé Tyr-c(D-Lys-Phe-Phe-Asp)-NH₂ (**Figure 90c**), caractérisé par une affinité pour MOPr améliorée (498 fois sélectif à DOPr) ainsi qu'une nette augmentation de la stabilité plasmatique (90 % de peptide intact après 30 min, au lieu de 16 %).³³² La diminution de la taille du cycle à 16 membres a fortement diminué l'affinité pour DOPr (> 1 μ M). Au contraire, la réduction du cycle à 15 membres a résulté en une perte totale de l'affinité pour les récepteurs MOPr, DOPr et KOPr.³³³ Ainsi, les travaux de cette équipe illustrent bien toute la complexité de la tâche lorsqu'on désire concevoir

de nouveaux peptides opioïdes. Finalement, le même mode de cyclisation sur des analogues de dynorphine A, a permis l'obtention de composés hautement sélectifs pour KOPr (1 fois par rapport à MOPr et plus de 1000 fois par rapport à DOPr (**Figure 90d**).³²³

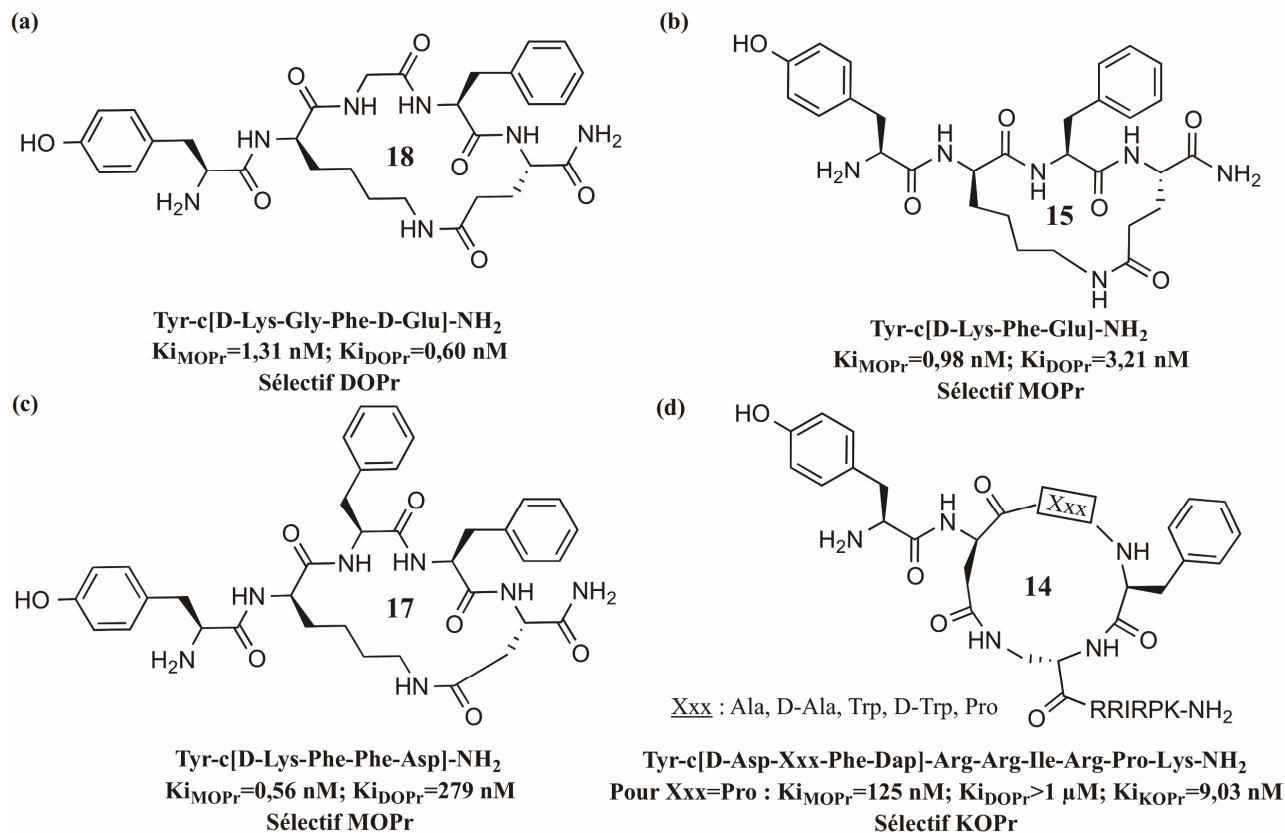


Figure 90. Structures chimiques de peptides opioïdes macrocycliques via lactamisation entre chaînes latérales.

La fermeture de cycle toujours entre les positions 2 et 5 par formation de pont disulfure entre deux résidus soufrés a fourni les composés D-Cys²-D-Cys⁵-Enképhaline (DCDCE), D-Pen²-D-Pen⁵-Enképhaline (DPDPE) et Tyr-c(D-Cys-Phe-D-Pen)-OH (JOM-13) (**Figure 36**), déjà mentionnés plusieurs fois au cours de cet ouvrage. Ils sont à ce jour parmi les peptides cycliques les plus sélectifs de DOPr, notamment grâce à la présence de groupes gem-diméthyles en position 5. Rappelons que l'insertion d'un pont éthane entre les deux soufres de JOM-13 agrandit la taille du cycle et convertit le composé en agoniste MOPr (JOM-6, **Figure 36**).²³⁵ Aussi, l'introduction d'halogènes en position para du noyau aromatique de Phe⁴ augmente sensiblement l'efficacité des composés.³¹⁴

3.2. Remplacement du pont disulfure.

3.1.1. Problématique

Aussi intéressantes que puissent être les molécules dérivées du DPDPE ou de JOM-13, la présence d'un pont disulfure sur leur séquence peut éventuellement poser problème. En effet celui-ci pourrait facilement être sujet à la métabolisation *in vivo*, ou à l'ouverture spontanée du lien et donc la perte de l'affinité sélective pour DOPr.

Afin d'y remédier, plusieurs solutions ont été proposées par plusieurs équipes de recherche (**Figure 91**).

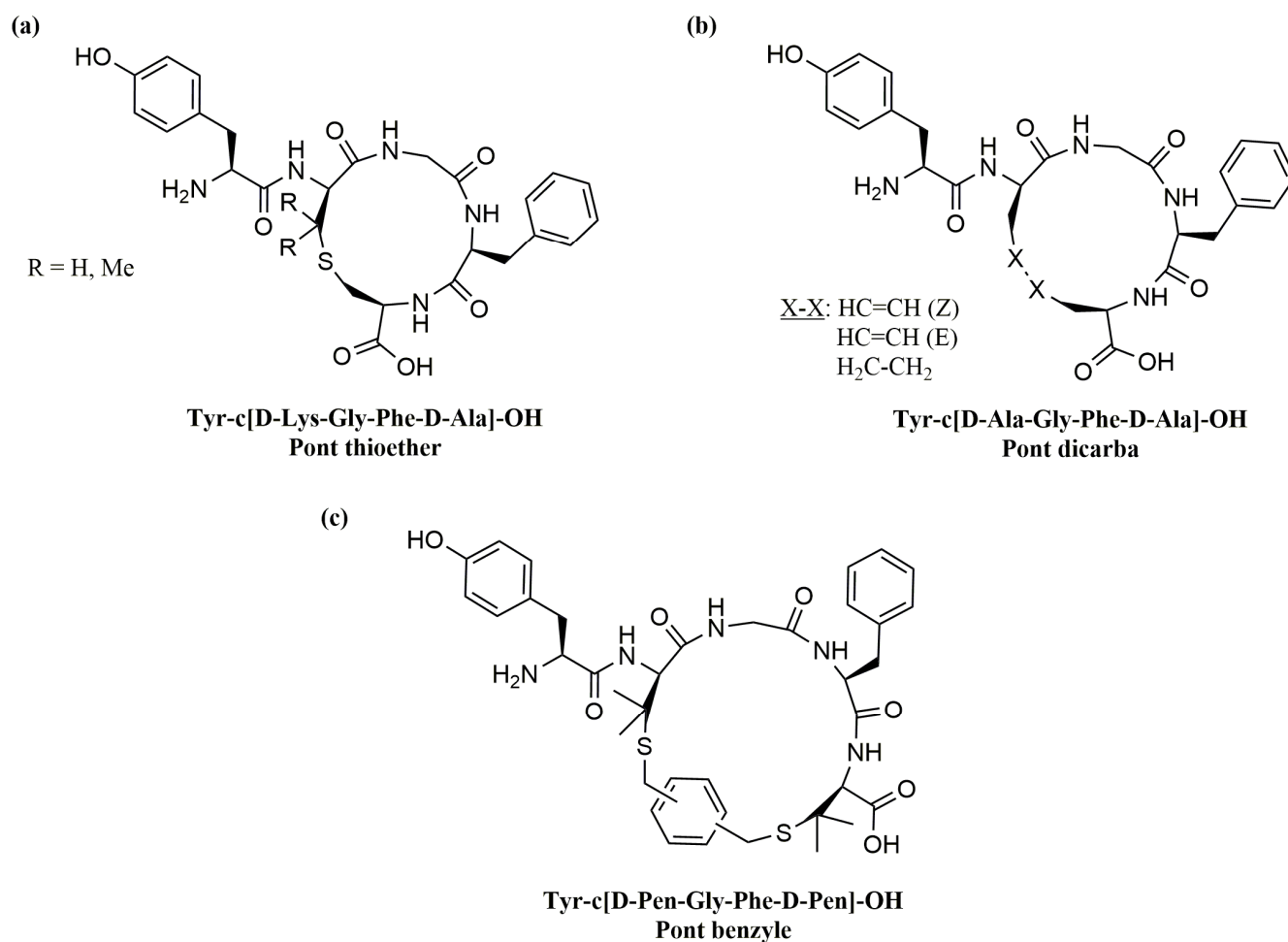


Figure 91. Structures chimiques de molécules où le pont disulfure a été remplacé par (a) un thioéther, (b) un pont dicarba ou (c) par un espaceur benzyle.

Premièrement, Rew et al. ont proposé en 2002 le remplacement du pont disulfure par un lien thioéther moins sensible en conditions enzymatiques et offrant une rigidité plus grande (diminution de la taille du cycle), entre les positions 2 et 5 (**Figure 91a**).³³⁴ Les peptides synthétisés ont révélé une très bonne sélectivité pour les composés portant un groupe gem-diméthyle en position α du soufre (677 fois plus sélectif à DOPr par rapport à MOPr). Le gain de stabilité obtenu (5 fois), a permis d'augmenter la nociception chez les animaux.

L'équipe de Hruby a suggéré la possibilité de remplacer le pont disulfure par un espaceur éthylène de stéréochimie Z ou E ou sa forme saturée (**Figure 91b**).³³⁵ La force de cette stratégie repose sur la possibilité de synthétiser entièrement la séquence peptidique en phase solide en utilisant une allylglycine en position 2 et 5, avant d'être finalement cyclisée par métathèse, toujours en phase solide. Une augmentation de l'affinité a pu être observée pour les composés portant un ligand éthylène comparé à l'analogue linéaire (0,43 nM au lieu de 8 nM), mais accompagné d'une perte de la sélectivité pour DOPr (127 fois moins sélectif que le DPDPE). Schiller et ses collègues ont appliqué la même approche sur des agonistes mixtes MOPr/KOPr.³³⁶ Une perte de la sélectivité a pu être observée (sélectivité MOPr de 3). Cette perte de sélectivité peut s'expliquer par l'absence des groupes gem-diméthyles.

Récemment, Stefanucci *et al* ont introduit un espaceur benzylique entre deux pénicillamines en position 2 et 5, sur différentes positions du noyau aromatique (**Figure 91c**). Malheureusement, une perte de l'affinité sur DOPr (d'un ordre de grandeur de 5 à 120 fois) ainsi qu'une baisse de la sélectivité (de 15 à 195 fois moins sélectif que le DPDPE) a été observée.³³⁷

En y regardant de plus près, le groupement triazole pourrait être un bon mime de pont disulfure. Cette fonction existant sous deux régioisomères, les formes 1,4 et 1,5 (**Figure 92a**), possèdent un repliement et une distance interatomique proches d'un pont disulfure. Cette approche a d'ailleurs déjà été utilisés pour d'autre cibles biologiques et gagne de plus en plus de popularité.³³⁸ À notre connaissance, elle n'a pas encore été utilisée pour le développement de macrocycles opioïdes, bien qu'elle ait déjà été utilisée par notre équipe en tant qu'isostères de fonctions amides.²⁴⁶

L'engouement pour cette stratégie peut s'expliquer par le fait qu'elle s'appuie sur la chimie « click », propre, facile à réaliser et compatible avec la phase solide. Dans un cas classique, une propargylglycine

(ou propraglycine), jouant le rôle d'alcyne, et un résidu amino converti au préalable en azoture (Dap-N₃, Dab-N₃, Orn-N₃, Lys-N₃) sont insérés dans la séquence, où ils vont rester inertes chimiquement jusqu'à l'étape de finale de cyclisation, elle aussi réalisable sur support solide. Dépendamment du catalyseur utilisé, l'un ou l'autre des isomères peut être obtenu sélectivement. L'utilisation de cuivre (*Copper(I)-catalysed Azide-Alkyne Cyclisation*, CuAAC) va former le composé 1,4, tandis que l'utilisation d'un catalyseur au Ruthénium (*Ruthénium(II)-catalysed Azide-Alkyne Cyclisation*, RuAAC) forme l'isomère 1,5.^{339,340}

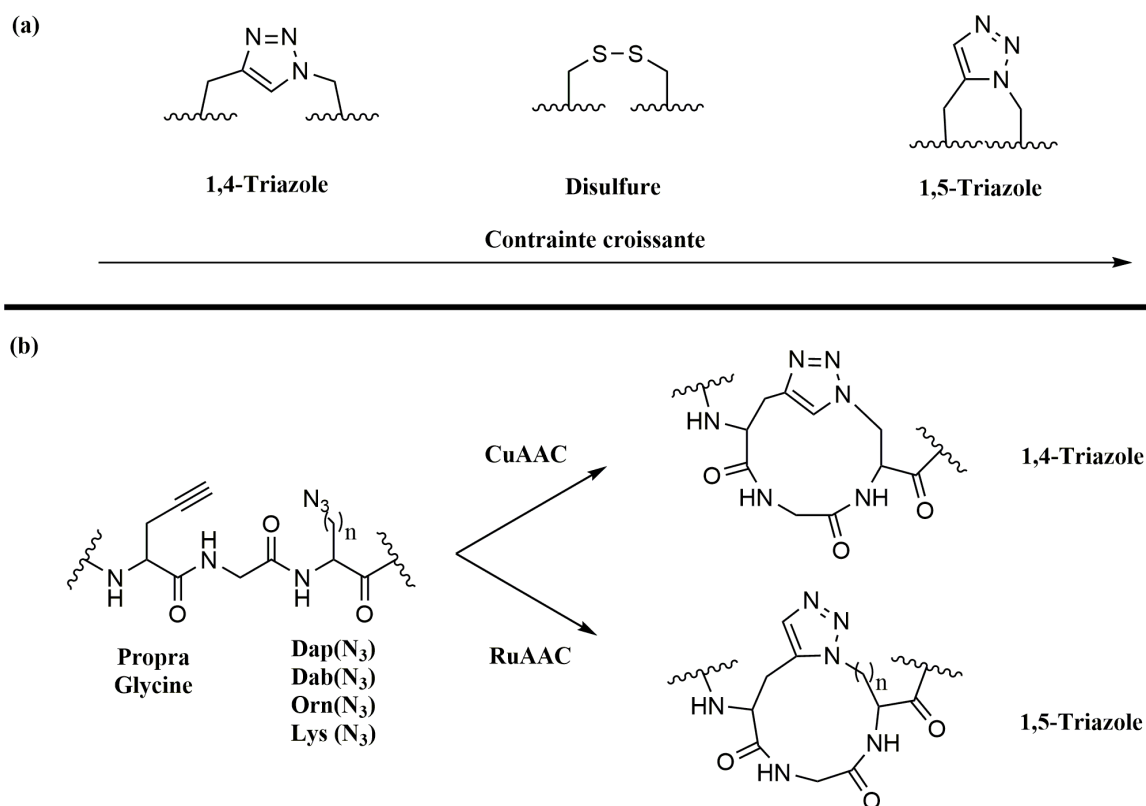


Figure 92. Le pont disulfure comparé aux deux isoformes de triazole (a). Obtention des deux isomères de triazoles à partir du même précurseur, en fonction du catalyseur utilisé.

Ainsi, nous proposons au cours de ce chapitre de réaliser la synthèse d'analogues de DPDPE et de JOM-13 portant un espaceur triazole de forme 1,4 ou 1,5 à la place du pont disulfure, afin d'étudier l'influence d'une telle modification sur l'affinité ou l'activité biologique envers les récepteurs opioïdes. Afin de mimer les peptides parents, les résidus de stéréochimie D en position 2 et 5 seront remplacés par la D-propraglycine et la D-Dap(N₃). Les séquences linéaires (**40** et **43**, **Figure 93**) seront d'abord synthétisées

avant d'être cyclisées soit par RuAAC pour l'obtention des isomères 1,5 (**41**, **44**, **Figure 93**), ou par CuAAC afin d'obtenir les isomères 1,4 (**42**, **43**, **Figure 93**).

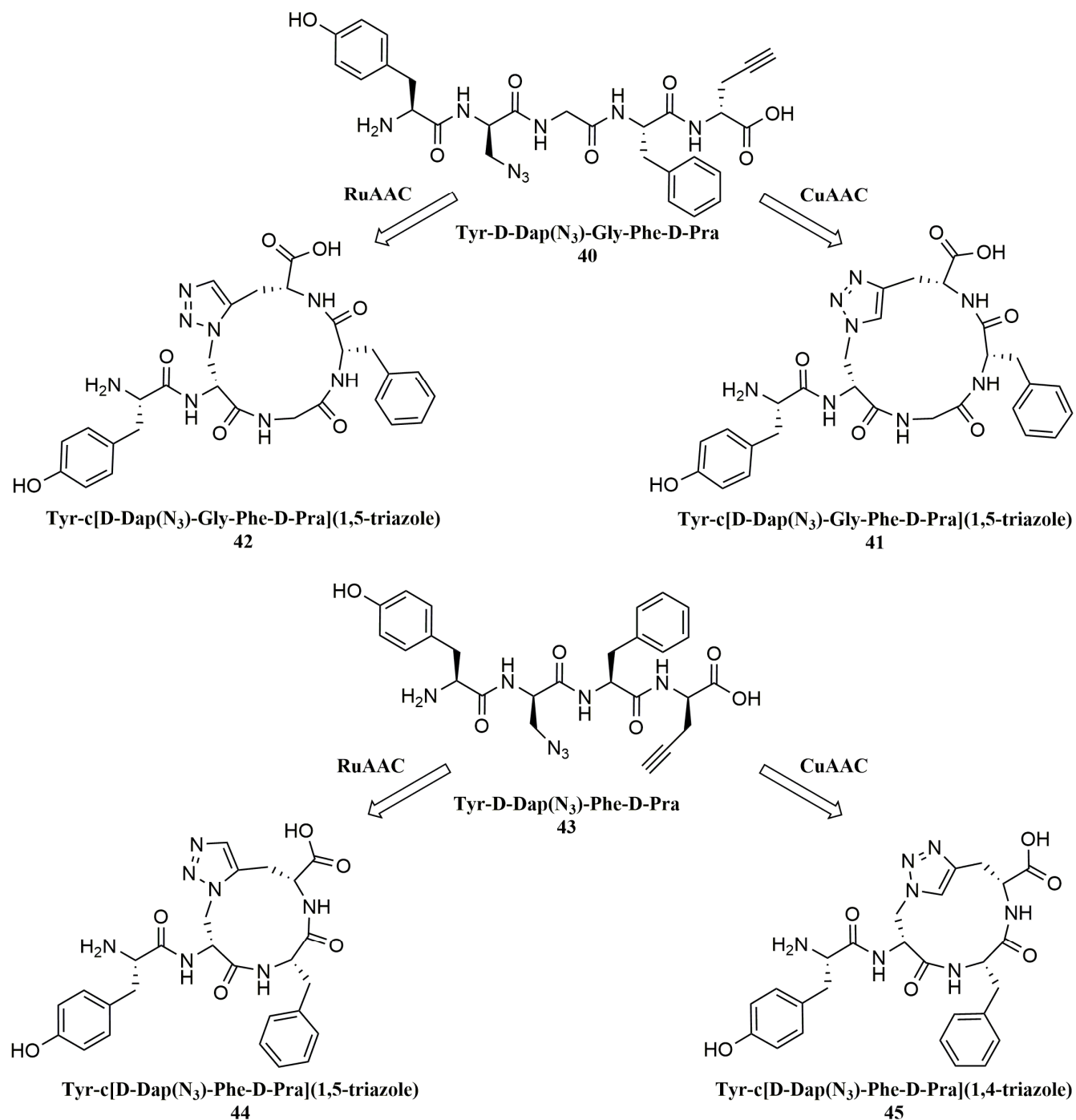


Figure 93. Structure chimique des analogues proposés de DPDPE et JOM-13, portant un triazole en place du pont disulfure.

Bien que l'absence de groupes gem-diméthyles puisse laisser présager une diminution de la sélectivité, il a été choisi de faire sans dans un premier temps, afin de vérifier la faisabilité de cette méthodologie.

3.2.2 Synthèse.

De façon similaire aux chapitres précédents, le premier acide aminé (ici la D-Proparglycine, D-Pra) a été ancré sur la résine 2-chlorotrityle, avant de poursuivre la synthèse des séquences peptidiques sur support solide qui s'est déroulée sans encombre. Une fois les peptides désirés obtenus, une portion de la résine a été clivée en condition acide afin d'obtenir les deux précurseurs linéaires **40** et **43**, et servir de référence HPLC au moment de produire les analogues cycliques.

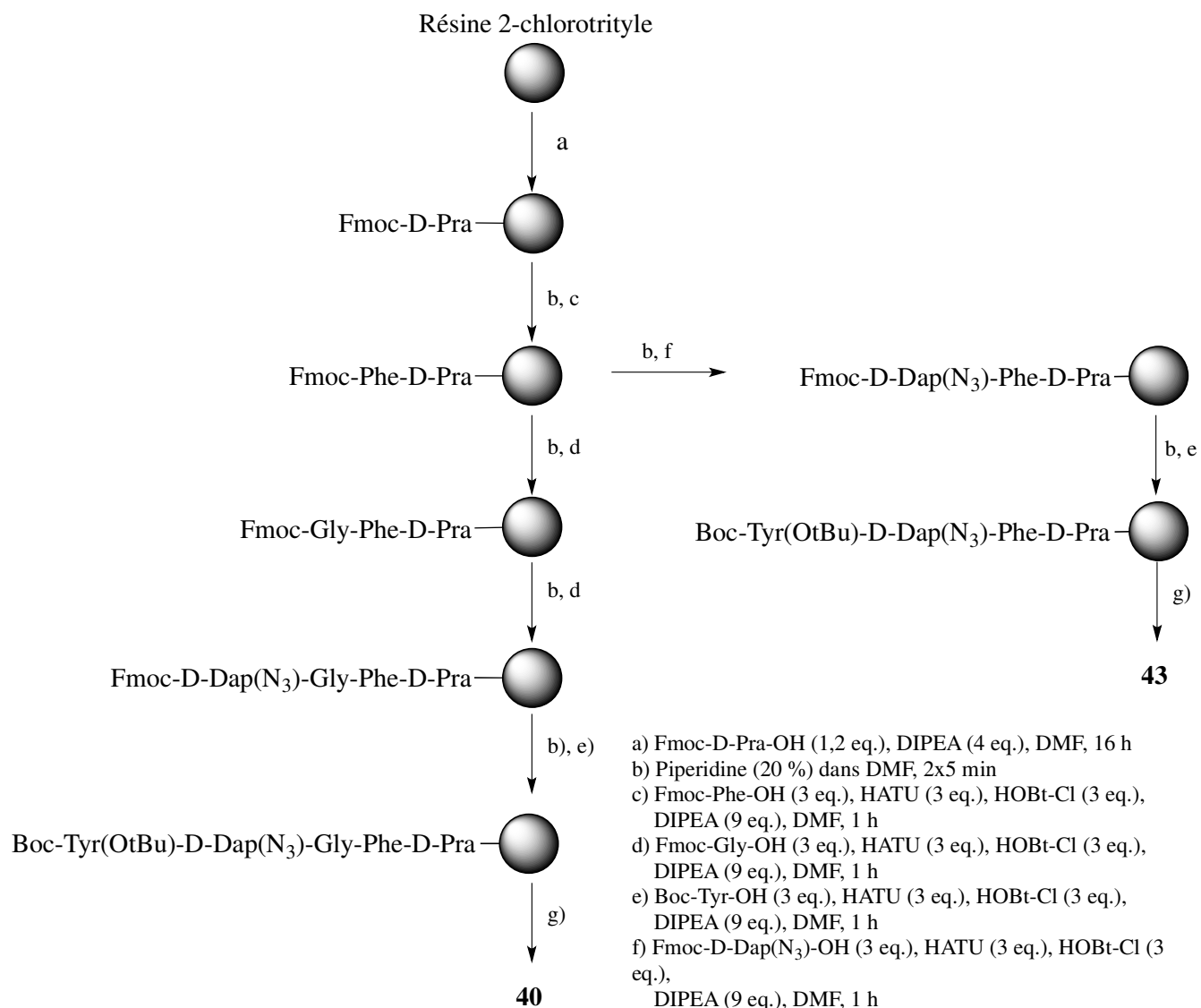


Schéma 10.

Les deux analogues de DPDPE **41** et **42** ont ensuite été cyclisés par chimie click en phase solide (**Schéma 11**), selon des protocoles décrits dans la littérature.^{341,342} Les macrocycles étant toujours fixés sur résine, la séparation des catalyseurs, souvent pénibles pour ce type de réaction, est ici aisée par simple filtration et lavages, avant de procéder au clivage des peptides en milieu acide.

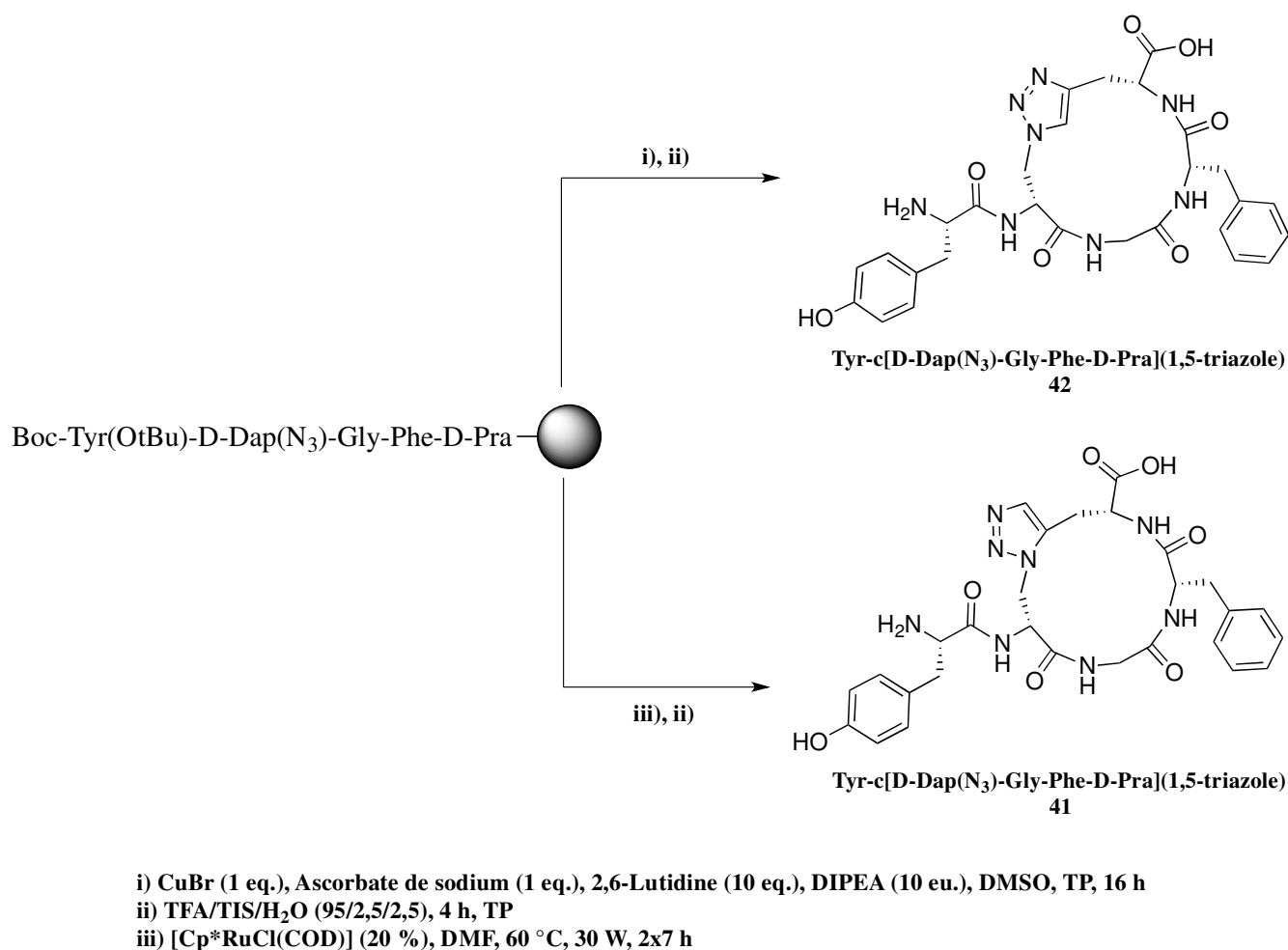


Schéma 11.

Le traitement de la résine avec du cuivre I en milieu basique a permis la conversion totale en sa forme cyclisée en 16 h, où le pic HPLC caractéristique du peptide linéaire à 24 min a disparu au profit d'un autre pic à 18 min, lui aussi associé à une masse de 593 (M+H)⁺ (**Figure 94**). Lorsque le catalyseur au Ruthénium a été utilisé et mis à réagir dans un réacteur micro-ondes, une conversion totale a été observée après deux séances d'irradiations, pour laisser place à un signal à 14 min également caractérisé par une masse similaire. Aussi, le signal visible en spectroscopie infra-rouge à 2112 cm⁻¹ présent sur les peptides

linéaires **40** et **43**, et correspondant à la fonction azoture, a totalement disparu dans le cas des macrocycles **41**, **42** et **45**, confirmant le succès de la réaction. La disparition du signal de l'acétylène ou l'apparition du signal associé au triazole n'ont cependant pas pu être observés, du fait de leur faible intensité par rapport aux signaux des autres fonctions sur les molécules.

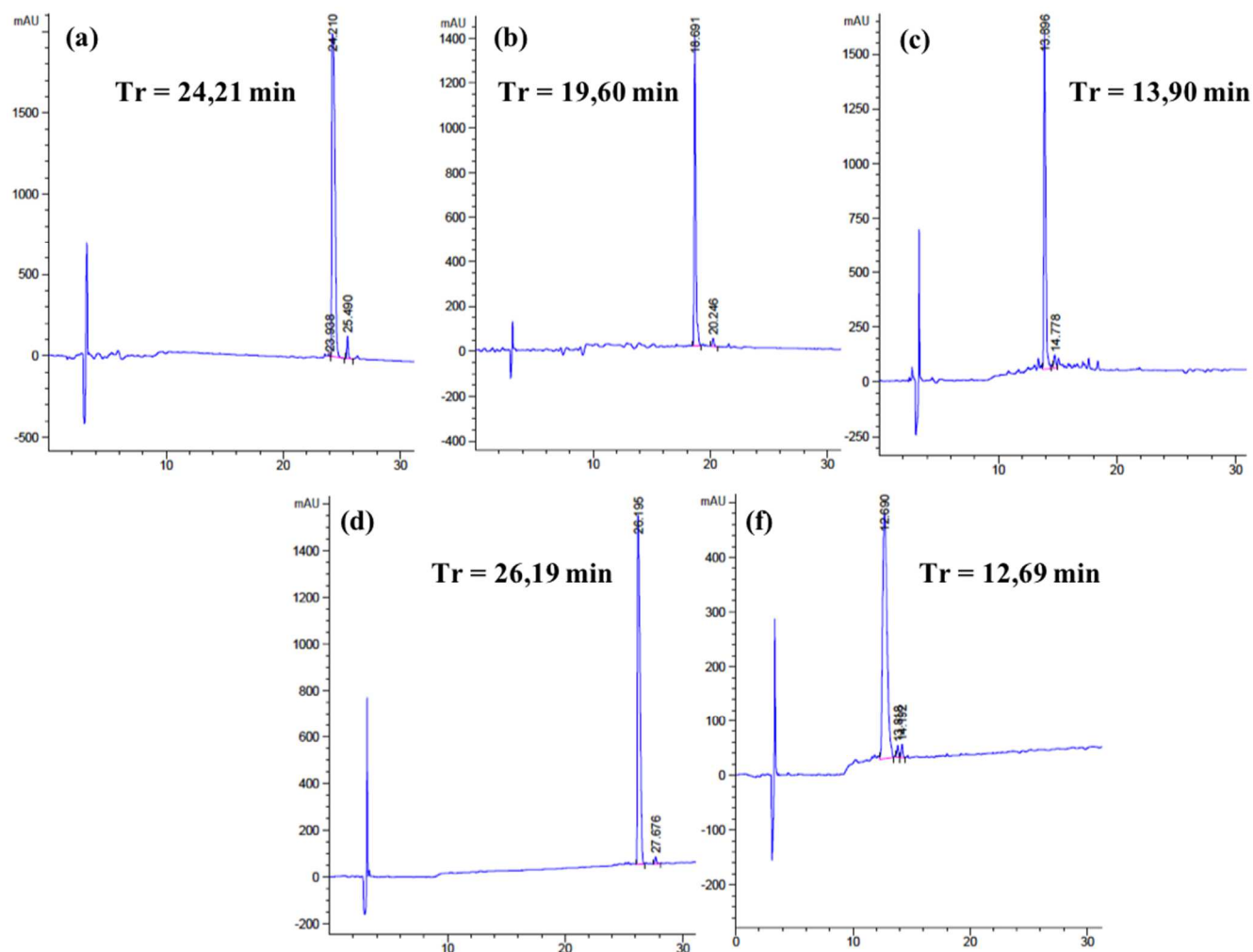
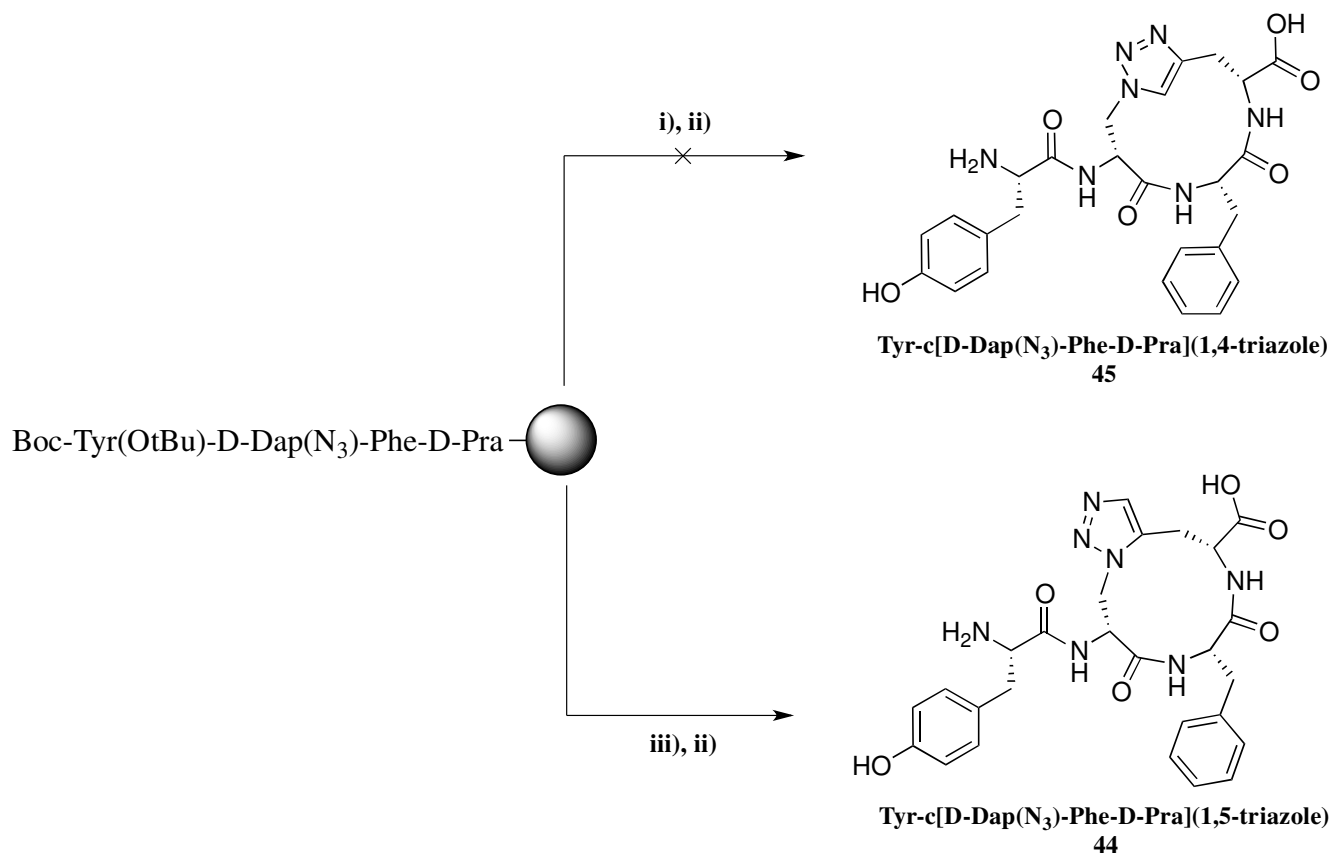


Figure 94. Spectres HPLC du peptide linéaire **40** (a), du macrocycle **41** obtenu par CuAAC (b), du macrocycle **42** obtenu par RuAAC (c), du peptide linéaire **43** (d), du macrocycle **45** obtenu par RuAAC (e)

La même stratégie a ensuite été appliquée pour les précurseurs d'analogues de JOM-13 (**Schéma 12**). Malheureusement, seul un mélange réactionnel complexe a été obtenu pour la réaction de CuAAC, rendant impossible l'obtention du composé désiré suffisamment pur pour des tests ultérieurs. Cela peut être expliqué par la trop petite taille du cycle (11 carbones pour **45** au lieu de 12 carbones pour **46**) Par

manque de temps, une optimisation de la réaction n'a pas été tentée. La macrocyclisation par RuAAC a bien fonctionné, avec la disparition du signal linéaire à 26 min au profit d'un autre signal à 13 min en



- i) CuBr (1 eq.), Ascorbate de sodium (1 eq.), 2,6-Lutidine (10 equ.), DIPEA (10 eq.), DMSO, TP, 16 h
- ii) TFA/TIS/H₂O (95/2,5/2,5), 4 h, TP
- iii) [Cp*RuCl(COD)] (20 %), DMF, 60 °C, 30 W, 2x7 h

Schéma 12.

HPLC.

3.2.3. Tests biologiques des composés 40, 41, 42, 43 et 45.

Une fois synthétisés, l'affinité des différents analogues pour les récepteurs DOPr et MOPr a été mesurée (Tableau 19).

Tableau 19. Affinité des peptides **40-43** et **45** sur les récepteurs DOPr et MOPr.

Entrée	Séquence	Ki ^a	Ki ^a	Sélectivité ^b
		DOPr (nM)	MOPr (nM)	
1	Leu-enképhaline	0,41 ± 0,08	0,31 ± 0,08	0,76
	DPDPE	1,02 ± 0,40	57,3 ± 7,20	56,2
	JOM-13	1,58 ± 0,40	34,2 ± 5,10	21,6
40	Tyr-D-Dap(N ₃)-Gly-Phe-D-Pra	1,59 ± 0,97	0,13 ± 0,03	0,08
41	Tyr-c(D-Dap(N ₃)-Gly-Phe-D-Pra) (1,4-triazole)	12,4 ± 5,80	0,41 ± 0,12	0,03
42	Tyr-c(D-Dap(N ₃)-Gly-Phe-D-Pra) (1,5-triazole)	33,4 ± 70,7	19,0 ± 3,40	0,56
43	Tyr-c(D-Dap(N ₃)-Phe-D-Pra)	167 ± 94,5	26,5 ± 3,90	0,12
45	Tyr-c(D-Dap(N ₃)-Gly-Phe-D-Pra) (1,5-triazole)	1344 ± 776	103,1 ± 2,80	0,08

^aLes valeurs de Ki sont les moyennes de +/- S.E.M. de 3 à 5 expériences indépendantes. ^bLes valeurs de sélectivité sont calculées par le rapport Ki MOPr/Ki DOPr.

Le peptide linéaire **40** présente une affinité inférieure à celle de la Leu-enképhaline pour DOPr, en revanche son affinité pour MOPr est renforcée. Le macrocycle 1,4-triazole **41** suit la même tendance, avec une préférence pour MOPr encore plus marquée. Le composé 1,5-triazole **42** voit sa sélectivité pour DOPr légèrement améliorée. Concernant l'analogue linéaire de JOM-13 (**43**), celui-ci ne se lie quasiment pas au récepteur DOPr, mais conserve une affinité acceptable pour MOPr. Sa forme cyclisée 1,5-triazole (**45**) se comporte de la même façon, bien que les valeurs aient diminuée d'un ordre de 5. Ainsi, la plupart des composés synthétisés au cours de cette étude possèdent une nette préférence pour MOPr.

Les mesures d'EC₅₀ sur la voie de signalisation AMPc (**Tableau 20**), suivent la même tendance que les résultats d'affinités. La sélectivité des composés **40-42** pour MOPr, observée lors des résultats d'affinité est encore ici présente.

Tableau 20. Efficacité biologique *in-vitro* des peptides **40-43** et **45** sur la voie de signalisation AMPc.

Entrée	Séquence	EC ₅₀ ^a EPAC DOPr (nM)	EC ₅₀ ^a EPAC MOPr (nM)	Sélectivité ^b
1	Leu-enképhaline	0,15 ± 0,03	0,89 ± 0,45	6,00
	DPDPE	0,53	177	333
	JOM-13	0,45 ± 0,36	10,4 ± 9,50	23,1
40	Tyr-D-Dap(N ₃)-Gly-Phe-D-Pra	1,30 ± 0,30	0,74 ± 0,33	0,03
41	Tyr-c(D-Dap(N ₃)-Gly-Phe-D-Pra) (1,4-triazole)	4,20 ± 0,30	1,74 ± 0,43	0,41
42	Tyr-c(D-Dap(N ₃)-Gly-Phe-D-Pra) (1,5-triazole)	64,3	19,5	0,30
43	Tyr-c(D-Dap(N ₃)-Phe-D-Pra)	428 ± 272	565	1,32
45	Tyr-c(D-Dap(N ₃)-Gly-Phe-D-Pra) (1,5-triazole)	1650	7852	4,76

^aLes valeurs d'EC₅₀ sont les moyennes de +/- S.E.M. de 1 à 5 expériences indépendantes. ^bLes valeurs de sélectivité sont calculées par le rapport EC₅₀ MOPr/EC₅₀ DOPr.

Finalement le recrutement de la voie de signalisation β -arrestine a été évalué pour les différents composés **40-45**, (**Tableau 21**). Nous avons eu le plaisir de constater qu'aucun des macrocycles synthétisés (**41** et **42**) au cours de ce chapitre ne semble activer cette voie de signalisation, tant sur le récepteur DOPr que sur le récepteur MOPr, avec des valeurs largement inférieures à celles de la Leu-enképhaline ou même de la DPDPE. La même observation a pu être faite sur le précurseur linéaire **40**. Les faibles EC₅₀ obtenus pour les molécules **43** et **45** sont attribuables à leur faible affinité pour les récepteurs.

Ainsi, malgré des valeurs d'EC₅₀ sur la voie AMPc plus faibles, comparé aux peptides références (**1**, DPDPE, JOM-13), le caractère apparemment biaisé des composés **41** et **42** pourrait se révéler particulièrement intéressant. Rappelons que le recrutement de la β -arrestine est considéré comme responsable du phénomène de tolérance aux ligands opioïdes.

Tableau 21. Efficacité biologique *in-vitro* des peptides **40-43** et **45** sur le recrutement de la β -arrestine.

Entrée	Séquence	EC ₅₀ ^a β -arrestine	EC ₅₀ ^a β -arrestine
		DOPr (nM)	MOPr (nM)
1	Leu-enképhaline	2,30 \pm 0,70	510 \pm 102
	DPDPE	51,2 \pm 23,8	s.o. ^c
	JOM-13	15,1 \pm 7,90	s.o. ^c
40	Tyr-D-Dap(N ₃)-Gly-Phe- D -Pra	133	290
41	Tyr-c(D-Dap(N ₃)-Gly-Phe- D -Pra) (1,4-triazole)	1406	2742
42	Tyr-c(D-Dap(N ₃)-Gly-Phe- D -Pra) (1,5-triazole)	4825 \pm 1036	5821 \pm 5625
43	Tyr-c(D-Dap(N ₃)-Phe- D -Pra)	s.o. ^c	s.o. ^c
45	Tyr-c(D-Dap(N ₃)-Gly-Phe- D -Pra) (1,5-triazole)	s.o. ^c	s.o. ^c

^aLes valeurs d'EC₅₀ sont les moyennes de +/- S.E.M. de 1 à 5 expériences indépendantes. ^bLes valeurs de sélectivité sont calculées par le rapport EC₅₀ MOPr/ EC₅₀ DOPr. ^csans objets ; pas d'activation de la voie de signalisation

Au vu des résultats mitigés obtenus, les propriétés pharmacocinétiques (stabilité plasmatique, logD_{7,4}) n'ont pas été étudiées plus en profondeur.

3.2.4. Modélisation moléculaire.

Afin d'avoir une meilleure compréhension des données biologiques obtenues, les différentes molécules synthétisées ont été dockées dans la structure cristallographique 4N6H du récepteur DOPr (**Figures 95 et 96**).

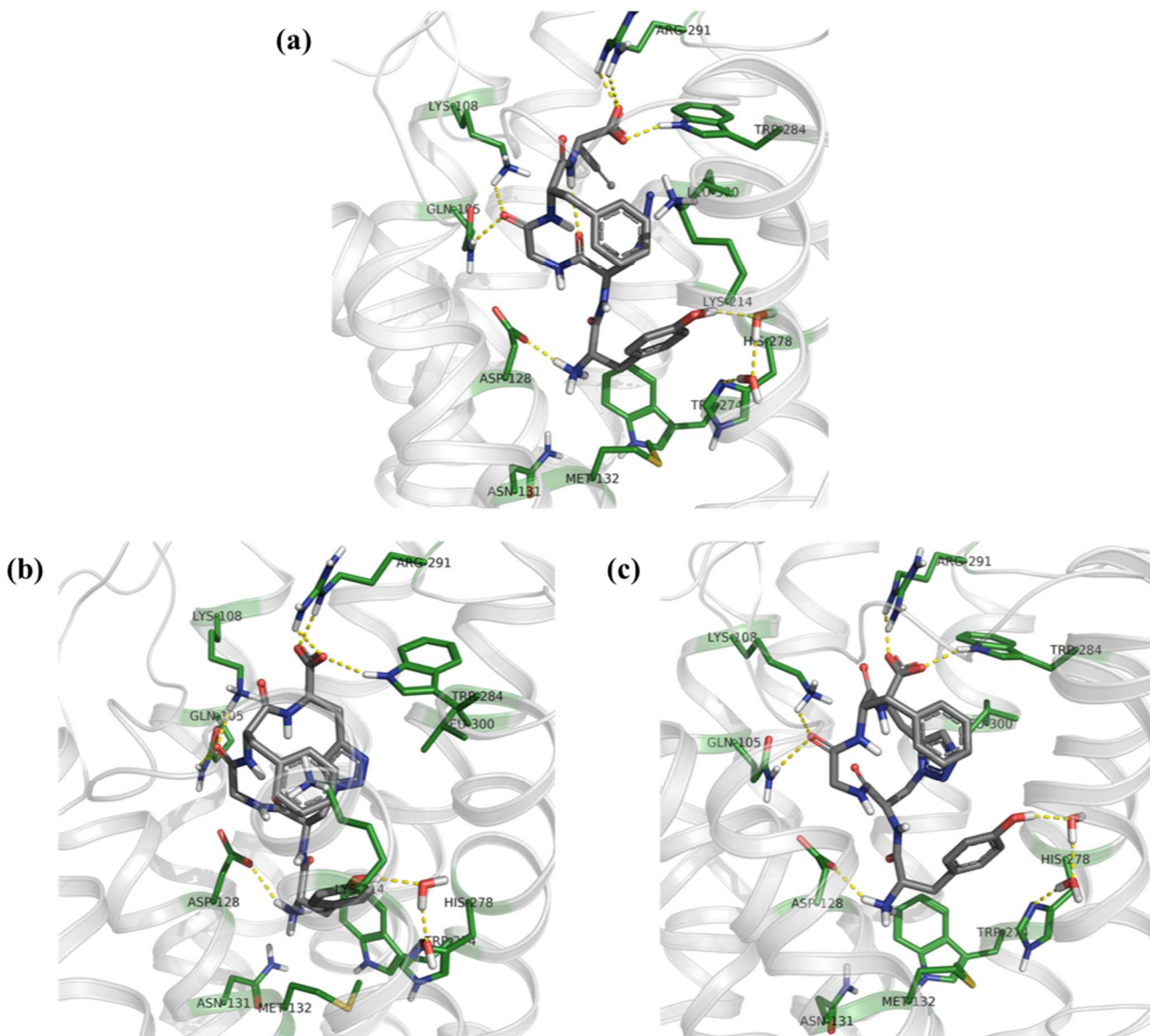


Figure 95. Docking induit (MOE) dans le récepteur DOPr 4N6H, des composés dérivés de la DPDPE.

(a) Forme linéaire **40**, (b) cyclique 1,4-triazole **41** et (c) cyclique 1,5-triazole **42**.

On peut constater que la partie « message » du récepteur ne semble pas perturbée par les différentes modifications réalisées, avec la conservation de interactions essentielles entre l'ammonium terminale et Asp128, et entre le phénol et His278 via deux molécules d'eau.

Concernant le peptide linéaire **40** (**Figure 95a**), on peut constater une mode d'interaction similaire à la Leu-enképhaline, expliquant une affinité pour DOPr similaire. En revanche, sa chaîne alcyne en position

5 est bien plus éloignée de Leu300, que ne l'est celle de la leucine dans le cas de la Leu-enképhaline. De ce fait le ligand peut plus facilement s'accommoder aux récepteurs ce qui pourrait expliquer la baisse de sélectivité entre DOPr et MOPr. Une observation similaire peut être faite pour le composé 1,4-triazole **41** (**Figure 95b**), où le noyau triazole est suffisamment éloigné de la poche hydrophobe de Leu300 pour être tolérant à MOPr. En revanche, le macrocycle **42**, du fait de la rigidification induite par le 1,5-triazole, positionne ce même noyau dans un environnement plus proche de Leu300 et crée donc de facto une légère diminution de la sélectivité pour MOPr.

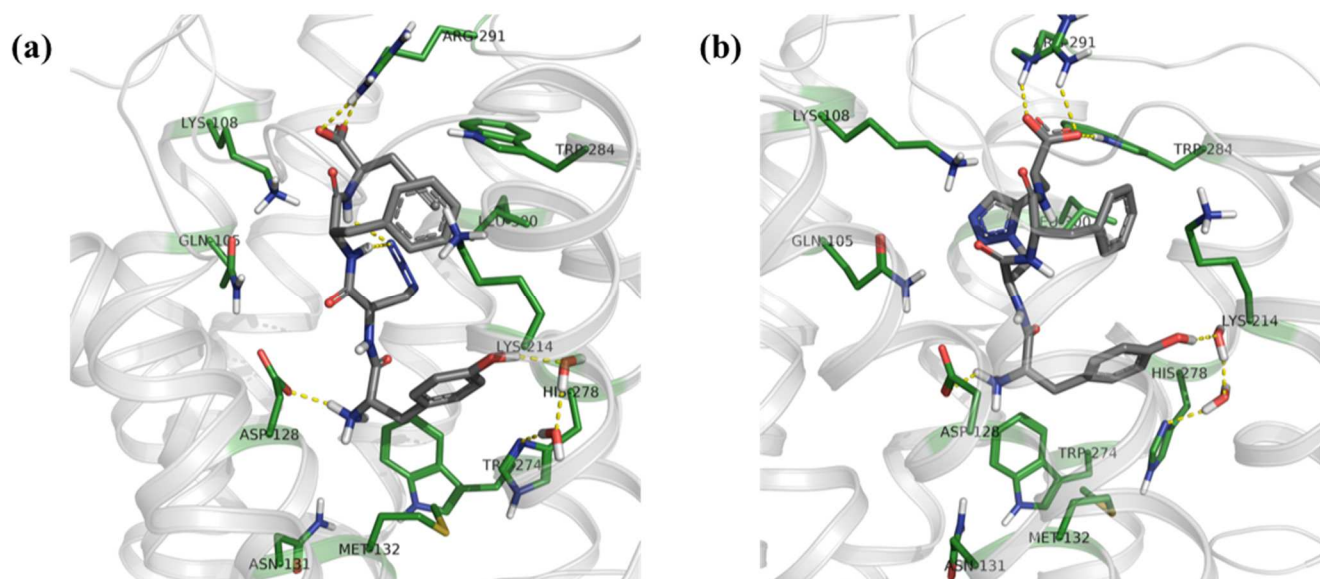


Figure 96. Docking induit (MOE) dans le récepteur DOPr 4N6H, des analogues de JOM-13. Forme linéaire **43** (a) et cyclique 1,5-triazole **45** (b).

Les modélisations des peptides **43** et **45** (**Figure 96**) semblent indiquer que les ligands occupent un espace moindre dans le récepteur comparé aux autres peptides, avec entre autres une perte des ponts salins avec Gln105, Lys108 et Trp284. Ces dockings ne permettent pas cependant d'expliquer une telle perte d'affinité pour DOPr et des analyses plus poussées (dynamique moléculaire) seraient nécessaires.

3.3. Conclusion.

La macrocyclisation est une bonne stratégie pour améliorer le profil pharmacocinétique de molécules actives. Les peptides macrocycliques DPDPE et JOM-13 sont parmi les analogues cycliques les plus sélectifs pour DOPr. Malheureusement leur pont disulfure est sujet à une forte instabilité plasmatique, menant à l'ouverture du cycle. Afin de remédier à ces problèmes de stabilité métabolique, nous avons cherché une alternative à ce groupe sensible. Après une étude de la littérature, il nous est apparu que des ponts triazoles pourraient être un substitut adéquat, du fait de leur taille et de leur conformation proche de celle de l'espaceur disulfure, pourrait être un substitut adéquat.

Pour ce faire, les précurseurs linéaires ont été synthétisés en phase solide en mettant à profit la compatibilité des fonction azoture et alcyne en position 2 et 5 (ou 2 et 4 pour le dérivé de JOM-13) des séquences. Nous nous sommes ensuite appuyés sur des méthodologies décrites dans la littérature pour préparer les différents macrocycles, toujours en phase solide, simplifiant ainsi la purification des analogues désirés.

Les test d'affinité et d'efficacité biologiques réalisés sur les récepteurs DOPr et MOPr, ont ensuite révélé que l'analogue linéaire de DPDPE **40** subissait une augmentation de l'affinité pour MOPr, de même que sa forme macrocyclique 1,4-triazole **41**. Le régioisomère 1,5-triazole, en revanche, était caractérisé par une perte de sélectivité pour DOPr moins importante que le peptide **40**. Les molécules dérivées du JOM-13, pour leur part, ont perdu toute affinité pour DOPr, que ce soit la forme linéaire **43** ou 1,5-triazole **45**. Les mesures d'activation de la voie AMPc ont suivi la même tendance. En revanche, nous avons eu l'agréable surprise de constater que tous les composés synthétisés semblent être biaisés, du fait de l'absence de recrutement de la β -arrestine.

Les études de docking réalisés par la suite ont indiqué que les composés **40** et **41** occupaient beaucoup moins efficacement la poche hydrophobe autour du résidu Leu300, expliquant ainsi la perte de sélectivité pour DOPr. Quant au macrocycle **42**, il semble placer son noyau triazole plus proche de ce résidu essentiel pour la sélectivité.

Dans l'ensemble, bien qu'ils n'atteignent pas totalement l'objectif escompté, les résultats obtenus sont plutôt encourageants, et riches d'informations. Ainsi, quelques explorations supplémentaires devraient permettre d'atteindre nos attentes.

Pour ce faire, il pourrait être intéressant de rallonger la taille de l'espaceur d'un carbone pour le composé **42** portant un 1,5-triazole. Il suffirait alors d'introduire un Dab(N₃) à la place du Dap(N₃) en position 2 de la séquence (**Figure 97a**). La modélisation de ce nouveau composé **46** (**Figure 97b**), révèle qu'en procédant ainsi, le noyau triazole se retrouverait beaucoup plus proche de Leu300, et pourrait améliorer de la sélectivité pour DOPr. De plus, la superposition de ce composé **46** avec le peptide **42** (**Figure 97c**) semble indiquer que la détente stérique induite par cette modification, permettrait d'optimiser le mode de liaison du composé dans la partie adresse du récepteur.

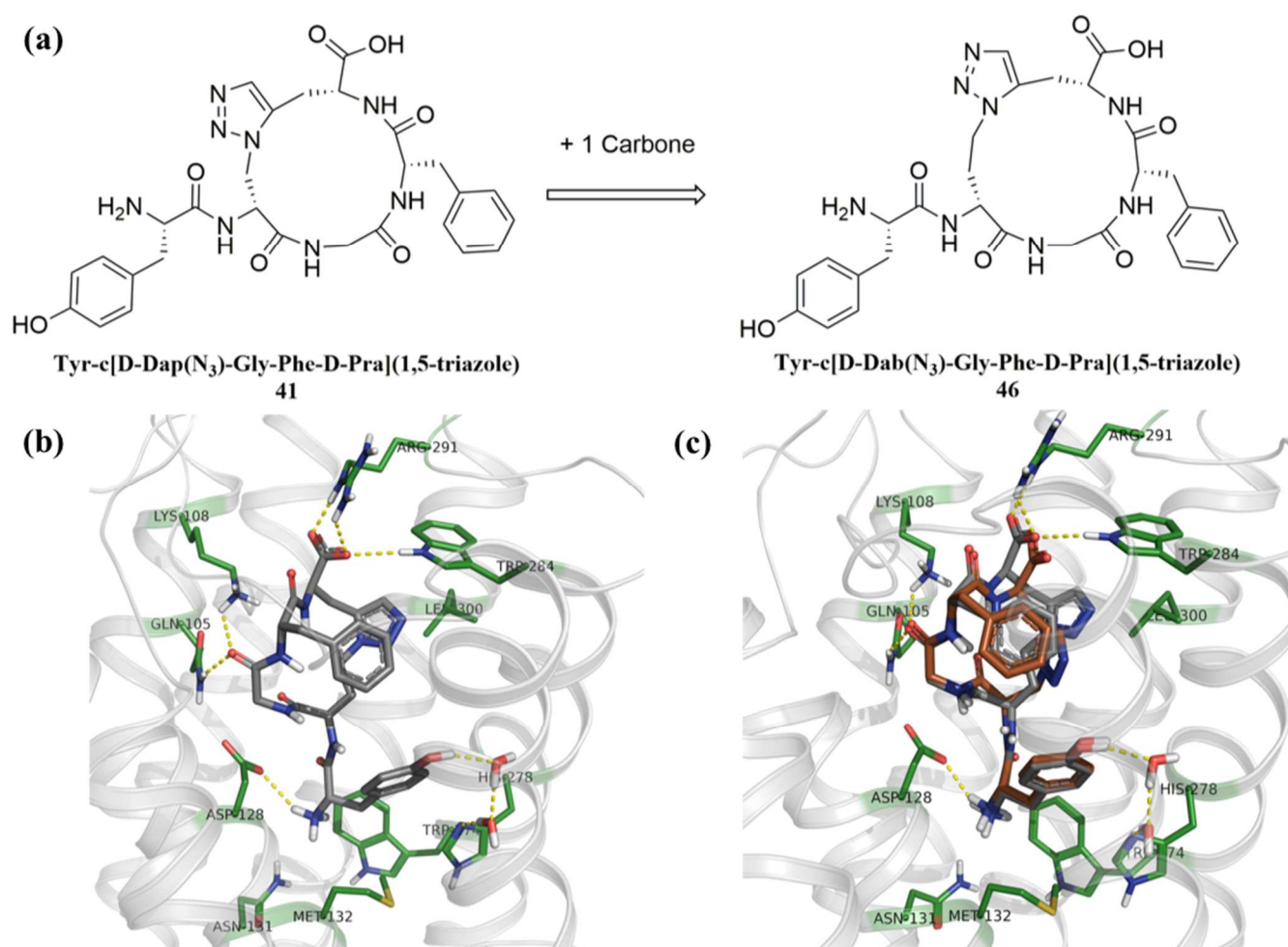


Figure 97. Augmentation de la taille du cycle d'un carbone pour former le macrocycle **46** (a), et son docking induit dans le récepteur DOPr 4N6H (b), ainsi que sa superposition avec le macrocycle **42** (c).

Concernant le composé 1,4-triazole (**41**), il serait possible de l'optimiser en ajoutant un gem-diméthyle en position α de l'alcyne, de façon analogue à la pénicillamine des macrocycles DPDPE et JOM-13 (**Figure 98**). Ces deux méthyles se retrouveraient alors à proximité de Leu300, laissant envisager une diminution de l'affinité pour MOPr.

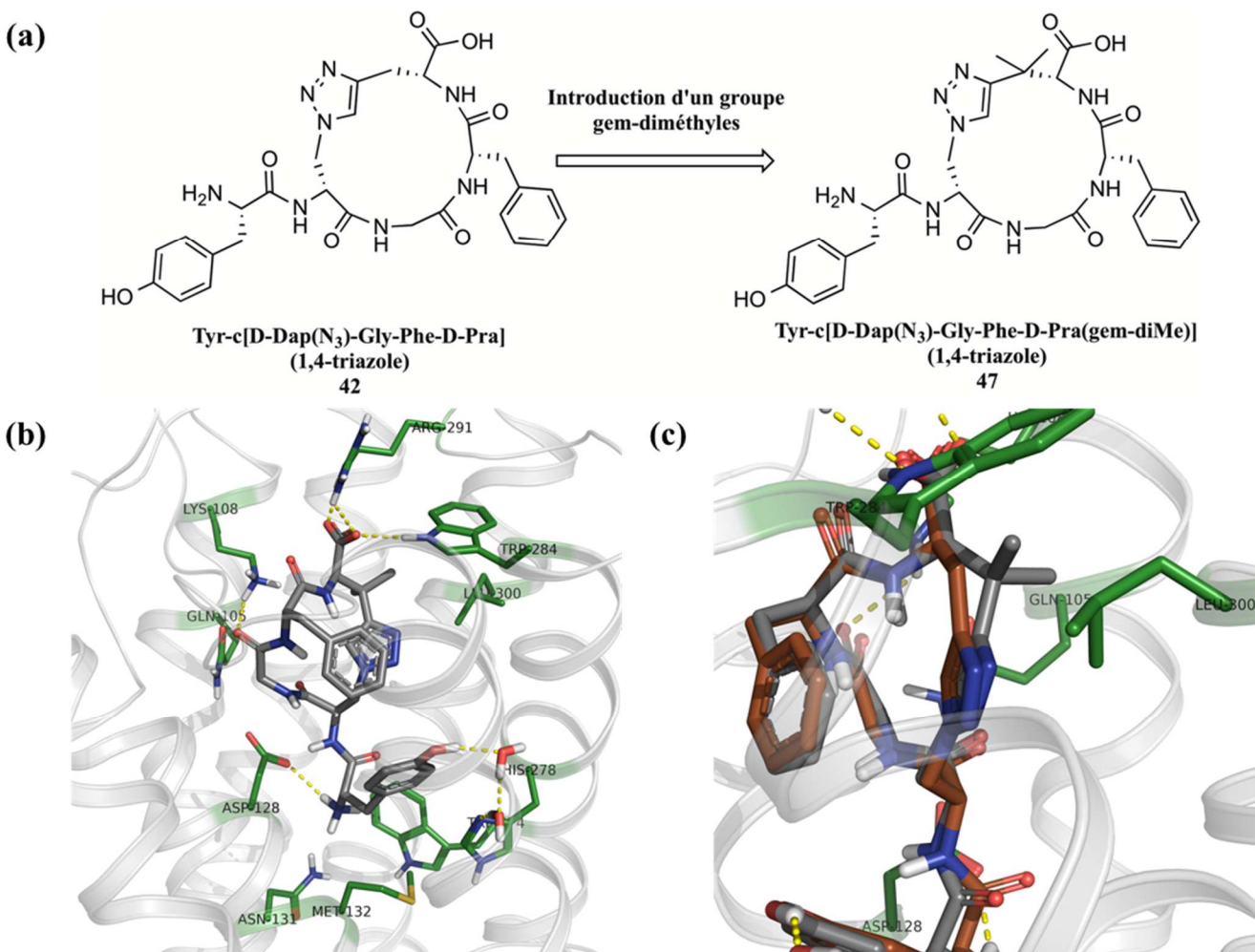


Figure 98. L'ajout d'un groupement gem-diméthyle en position α du noyau triazole pourrait augmenter la sélectivité du macrocycle **47** (a), et son docking induit (MOE) dans le récepteur DOPr 4N6H (b), ainsi que sa superposition avec le macrocycle **43** (en marron) (c).

La propraglycine modifiée pourrait être facilement obtenue en sept étapes en partant de l'acide D-aspartique protégé commercial (**Schéma 13**). Dans un premier temps, l'amine **48** serait protégé par un groupement 9-phenylfluorène dont l'intérêt sera de protéger la stéréochimie de l'acide aminé lors de

l'étape de diméthylation en présence de LiHMDS.³⁴³ L'amine et la chaîne latérale du composé **50** seront ensuite déprotégées par hydrogénation catalytique, avant de protéger à nouveau l'amine par un groupement Fmoc. L'acide **52**, sera ensuite converti en amide de Weinreb, avant réduction vers l'aldéhyde à l'aide de DIBALH. Finalement, l'aldéhyde **53** sera transformé en alcyne par homologation de Seyferth-Gilbert, et l'acide carboxylique sera déprotégé en condition acide pour donner la proparglycine modifiée, prête pour la synthèse sur support solide.

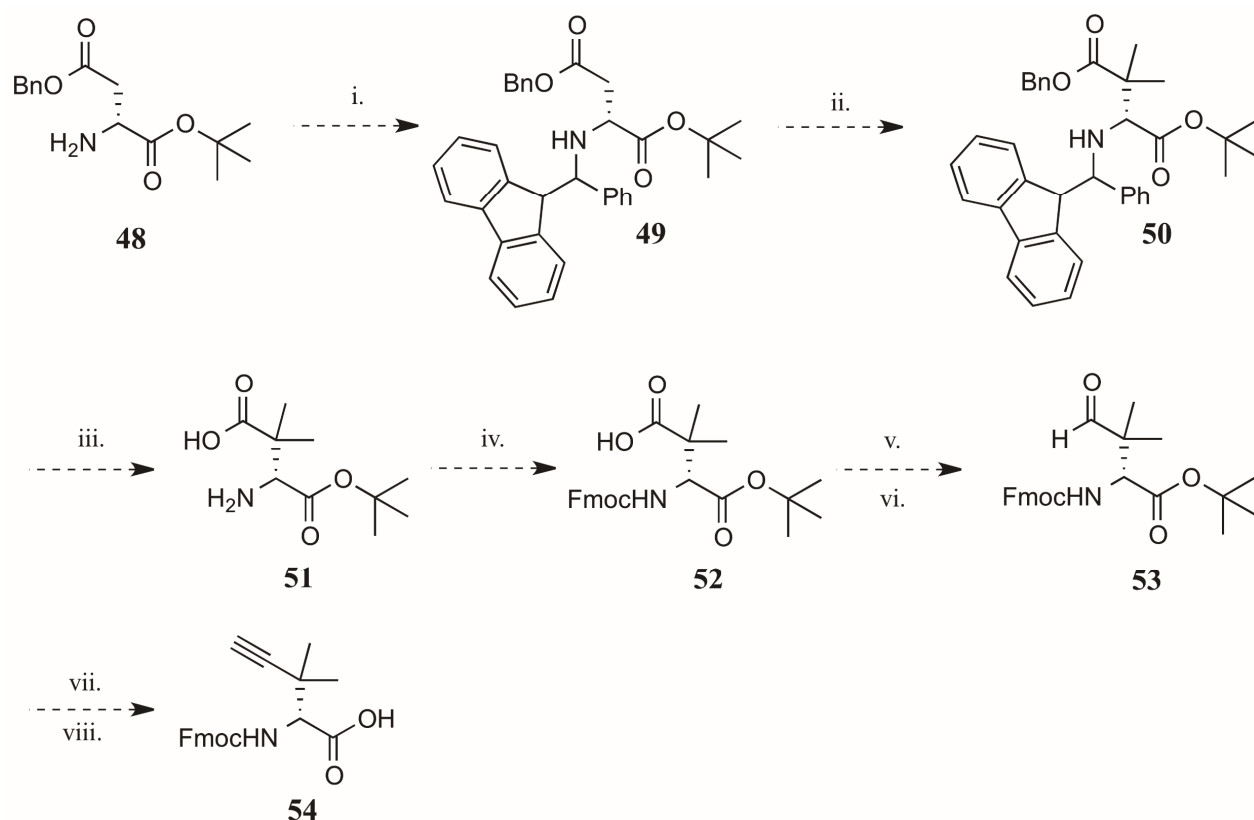


Schéma 13.

CHAPITRE 4 : INVESTIGATIONS COMPLÉMENTAIRES EN POSITION 2 DE LA LEU-ENKÉPHALINE ET CONCEPTION DE LIGANDS RADIOMARQUÉS AU FLUOR, POUR LE DIAGNOSTIC MÉDICAL

4.1. Introduction

La plus grande difficulté lors du traitement de la douleur chronique à l'heure actuelle, est la mauvaise compréhension des phénomènes impliqués lors de celle-ci, notamment au niveau du cerveau.^{344,345} En effet, il n'existe pas à proprement dit de « centre de la douleur », mais un réseau de régions du cerveau interconnectées entre elles, impliquées non seulement dans le signal douloureux, mais aussi dans les fonctions motrices, sensorielles ou cognitives.³⁴⁶ De plus, une composante psychologique s'ajoute à cette perception, rendant l'auto-évaluation de la douleur par le patient souvent inexacte.^{347,348} En fonction du type de douleur pathologique rencontrée, différentes zones du système central ou périphérique peuvent être touchées. De ce fait, la détermination exacte de ces zones impliquées, permettrait à moyen terme d'effectuer une médecine plus personnalisée à chaque patient en fournissant les molécules les plus susceptibles d'agir sur eux. Outre l'étude de la douleur, ce genre d'outils pourrait se révéler salutaire pour l'investigation des mécanismes impliqués dans les troubles d'addictologie, d'épilepsie ou les troubles de l'humeur, également reliés aux récepteurs opioïdes.^{349,350,351}

Longtemps limitée à l'étude post-mortem, le développement de techniques adaptées utilisables in vivo, appelé neuroimagerie fonctionnelle, a permis d'augmenter fortement notre compréhension des mécanismes de la douleur.³⁵² Ces techniques reposent sur la mesure des variations de l'activité neuronale, traduites par un bouleversement au niveau métabolique (flux sanguin, métabolisme du glucose) ou au niveau neurochimique (liaisons de neurotransmetteurs sur leurs récepteurs).^{353,354} La technique la plus répandue dans ce domaine est l'imagerie par résonance magnétique fonctionnelle (IRMf), qui mesure la différence de champs magnétique entre le sang oxygéné (oxyhémoglobine, *diamagnétique*) utilisé par les neurones actifs et le sang désoxygéné (désoxyhémoglobine, *paramagnétique*) ressortant de ces neurones.³⁵⁵ Cette technologie est particulièrement utile pour l'observation de la douleur aiguë, mais n'est pas la plus adaptée pour la mesure des changements associés à la douleur chronique.³⁵⁶ Il existe toutefois des variantes plus adaptées à l'étude de cette pathologie.^{357,358}

Une autre technique grandement utilisée est la tomographie par émission de positons (PET, *Positron Emission Tomography*).^{359,360} Son principe repose sur le greffage d'un radioisotope sur un ligand ou un médiateur biologique. Une fois arrivé à sa cible par circulation sanguine, le radioisotope très instable se désintègre en émettant un positron et un neutrino. Ce positron va alors très rapidement rencontrer un électron dans son voisinage. Les deux espèces vont ensuite s'annihiler en produisant deux photons de directions symétriquement opposées (180°). Dès lors, le détecteur de rayons gamma est capable d'enregistrer ces deux photons en concordance, permettant la localisation du ligand. Le signal est finalement traité informatiquement afin de cartographier la zone étudiée. Cette technologie présente l'avantage d'être très précise comparée aux autres techniques.³⁶¹ Elle est entre autres la seule à même de fournir une évaluation quantitative des récepteurs opioïdes dans le système nerveux central *in vivo*.³⁶²

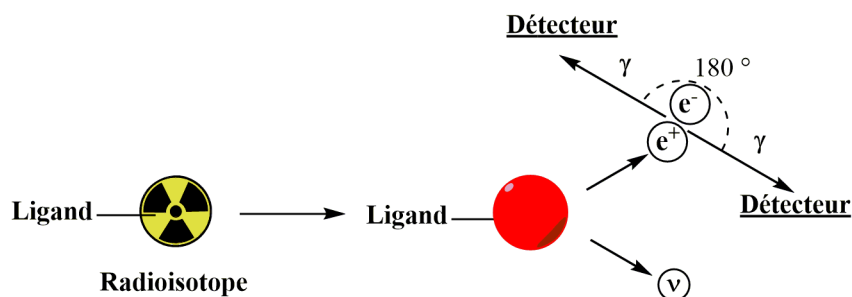


Schéma 14.

4.1.1. Les radioligands visant les récepteurs opioïdes dans la littérature.

En effet, outre son usage pour le diagnostic de maladie neurodégénératives (^{18}FTG),³⁶³ cette méthode a déjà été utilisée avec succès dans le domaine des récepteurs opioïdes,³⁶⁰ pour l'étude de l'expression des récepteurs opioïdes lors de douleur chronique, d'épilepsie,³⁵⁰ ou de chocs post-traumatiques.³⁶⁴ Plusieurs radioligands sont d'ailleurs déjà à la disposition de la communauté scientifique en clinique, tels que l'agoniste MOPr sélectif ^{11}C -carfentanyl,³⁶² ou l'agoniste KOPr ^{11}C -GR103545 (**Figure 99**).³⁶⁵

Concernant le récepteur DOPr, les efforts ont été essentiellement dirigés sur les dérivés de l'antagoniste Naltrindole.³⁶⁶ Ces derniers n'ont malheureusement pas permis une mesure suffisamment quantitative de ce récepteur, notamment du fait de leurs mauvaises propriétés pharmacocinétiques et de leur mode de liaison non spécifique.^{367,368} Un autre antagoniste DOPr dérivé du noyau Dmt-Tic a également été mise

au point.³⁶⁹ Malheureusement celui-ci n'était actif qu'au niveau périphérique. Ainsi, un radiotracer sélectif à DOPr et efficace au niveau du système nerveux central est encore à découvrir.

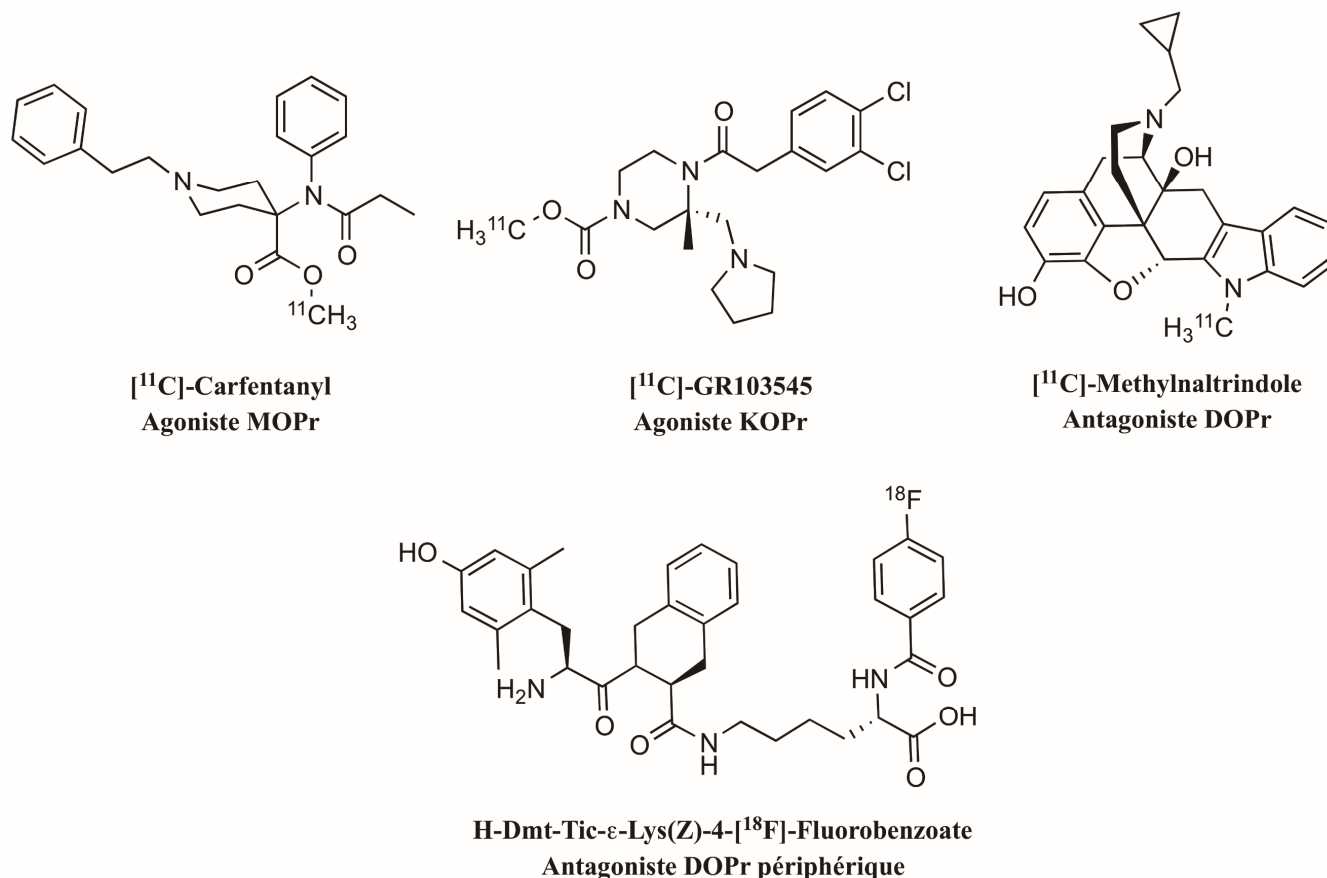


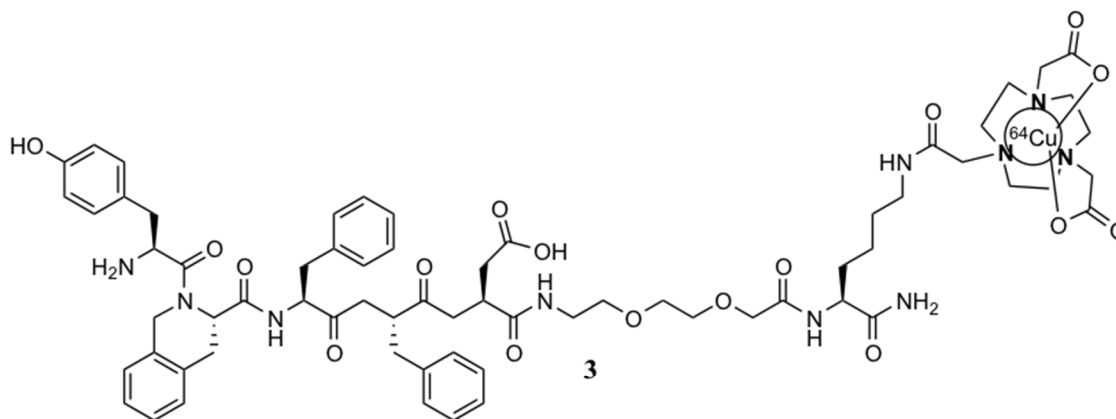
Figure 99. Radiotraceurs des différents récepteurs opioïdes développés.

Cet objectif en tête, des efforts de recherches ont d'ores et déjà été réalisés par notre équipe en collaboration avec l'équipe du Professeur Brigitte Guérin possédant une expertise en radiochimie.

4.1.2. Travaux précédents au laboratoire et description du projet.

Récemment, Azadeh Pirisedigh travaillant dans ce laboratoire en collaboration avec nous, a développé un peptide antagoniste radiomarqué au ⁶⁴Cu.³⁷⁰ Mettant à profit le motif DOPr hautement sélectif Tyr-Tic-Phe-Phe (TIPP) développé par Schiller, un chélateur bifonctionnel 1,4,7-triazacyclononane-1,4,7-triacétique acide (NOTA) permettant la complexation du métal a été greffé en position C-terminale du peptide, via un espaceur polyéthylèneglycol (PEG) (**Figure 100, haut**).³⁷¹ Au préalable, un acide

aspartique avait été rajouté en position 5, du fait de l'importance de maintenir un acide carboxylique à cet endroit pour maintenir une bonne sélectivité DOPr.



H-Tyr-Tic-Phe-Phe-Asp-PEG-Lys(NOTA/ ^{64}Cu)-NH₂

Ki_{DOPr} = 2,5 nM; Ki_{MOPr} > 10 μM

T_{1/2} > 2 h

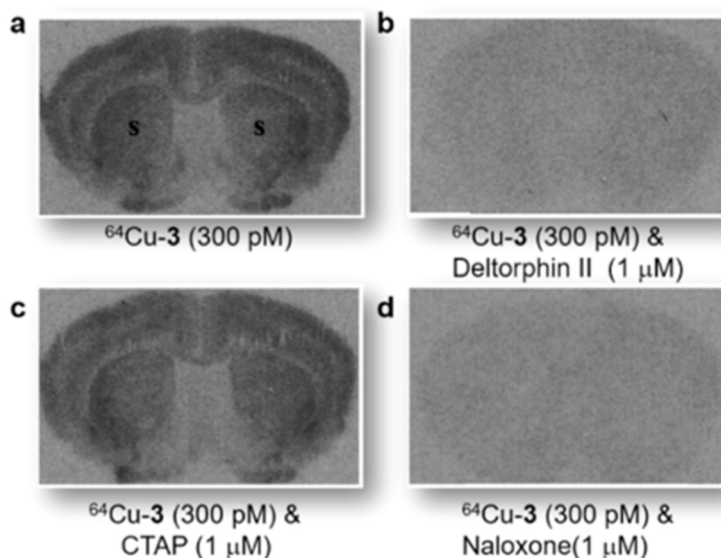


Figure 100. Peptide marqué au cuivre 64 récemment développé au laboratoire (haut).

Autoradiographie de coupes de cerveaux de rat sur lesquels ont été infusés une solution du peptide radiomarké (bas).³⁷⁰

Après complexation de cuivre « froid » (non radioactif), ce composé a manifesté de l'affinité et de la sélectivité pour DOPr supérieures à celle du peptide DIPP, confirmant de ce fait l'innocuité de la sonde sur les propriétés biologique du composé. Finalement, les tests d'autoradiographies effectuées sur des

coupes de cerveau (rat) avec le peptide radiomarqué au cuivre ont démontré l'activation sélective des récepteurs DOPr, validant ainsi l'éventuelle application de cette molécule pour l'imagerie TEP.

Nous souhaitons aussi concevoir un autre ligand agoniste DOPr plus proche de la structure de la Leu-enképhaline. Au cours de sa thèse, Arnaud Proteau Gagné a développé une série d'analogues de Leu-enképhaline portant une cystéine méthylée ^{11}C en position 2 (**Figure 101**).²⁴²

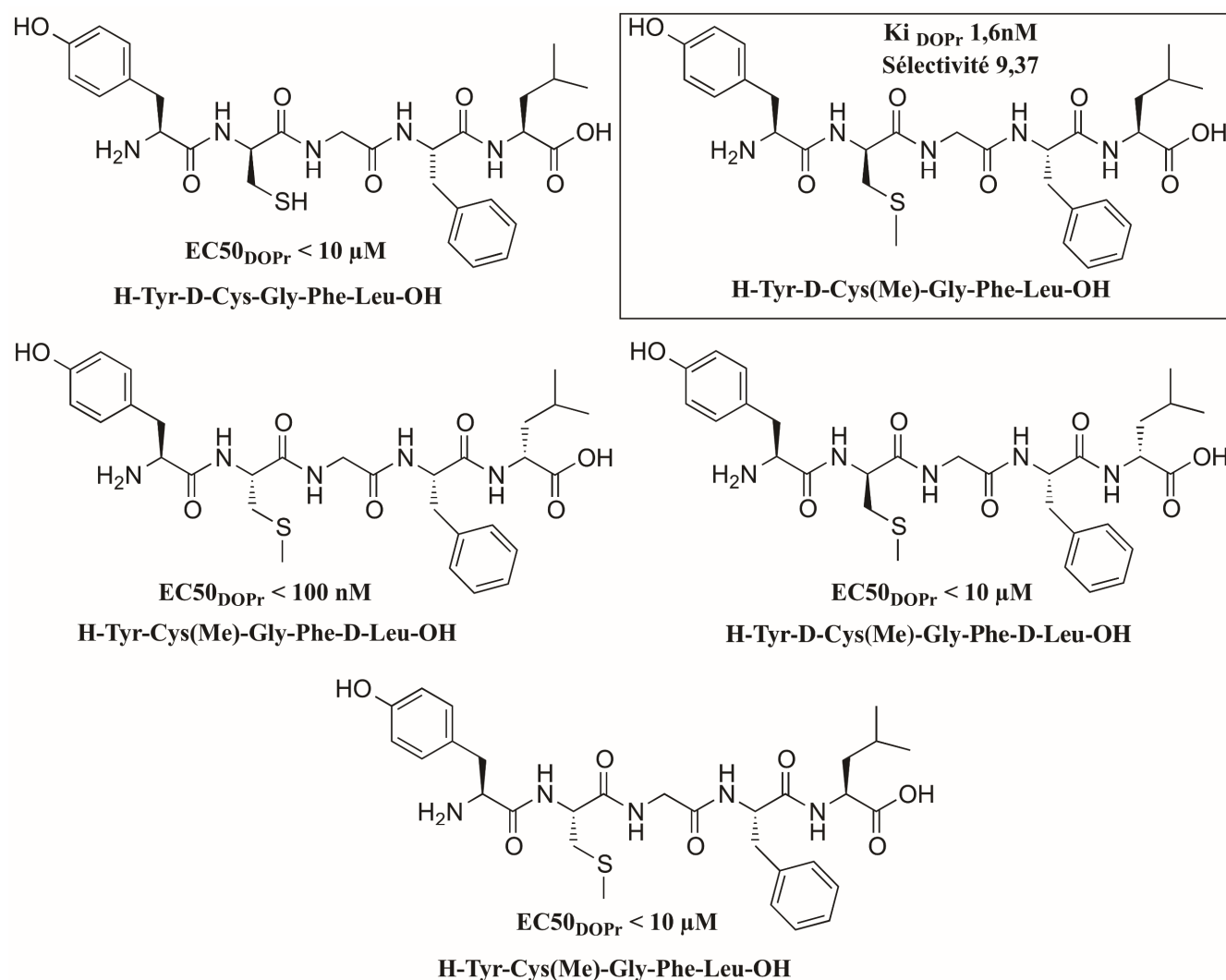


Figure 101. Série d'analogues de la Leu-Enképhaline portant une cystéine méthylée en position 2.

À l'intérieur de cette série, le composé D-Cys²-Leu⁵-enképhaline s'est démarqué avec une affinité et une efficacité supérieure à celle de la Leu-Enképhaline, ainsi qu'une sélectivité pour DOPr similaire. Les propriétés pharmacocinétique se sont vues également nettement améliorées, avec une stabilité

plasmatique supérieure à 6 h, ainsi qu'un $\log D_{7,4}$ légèrement supérieur à 0. Le radiomarquage au ^{11}C effectué par la suite sur cette molécule, a permis de prouver la faisabilité d'une telle stratégie pour la mise au point d'une nouvelle classe d'agents de diagnostic des récepteurs opioïdes.

Bien que prometteur, nous désirions introduire sur la cystéine un ^{18}F à la place du ^{11}C . En effet, contrairement au ^{11}C possédant un temps de demi-vie de 20 min, le fluor possède une demi-vie six fois plus grande (110 min).³⁷² De ce fait, une plus grande flexibilité serait laissée tant pour la production du radiotracer, que pour la réalisation de l'analyse d'imagerie où plusieurs acquisitions vont être possibles avec un même lot de radioligands. Le cuivre présente des propriétés nucléaires attrayantes. Mais pour ce type d'analyses, son temps de demi-vie élevé (13 h) soulève le problème de surexposition tant pour le patient que pour les praticiens.³⁷²

Du fait de problèmes de stabilité in vivo, il n'est cependant pas possible d'introduire directement un atome de Fluor en position α du soufre de la cystéine. Ainsi, nous décrivons, dans le travail rapporté ici, la synthèse d'analogues dérivés de la séquence Tyr-D-Cys-Gly-Phe-Leu portant des chaînes fluoroalcanes de tailles croissantes (**Figure 102**), et leur influence sur les propriétés pharmacodynamiques et pharmacocinétiques. Il est d'ailleurs raisonnable de supposer que l'ajout de telles chaînes alcanes devraient améliorer l'hydrophobicité et la stabilité des ligands, propriétés qu'il faut optimiser pour obtenir d'un radiotracer efficace dans le SNC.

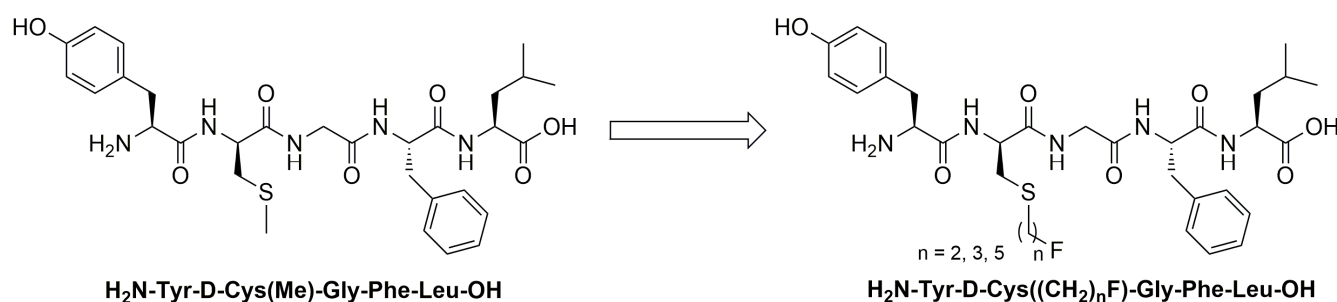


Figure 102. Introduction de chaînes fluoroalcanes de tailles variables sur la séquence de la Leu-enképhaline modifiée.

À l'issue des tests biologiques, le meilleur candidat sera sélectionné pour effectuer le radiomarquage au ^{18}F .

4.2. Synthèse.

La synthèse de toutes les molécules présentées dans cette section a été réalisée par Azadeh Pirisedigh. Dans un premier temps, le précurseur peptidique Tyr-D-Cys-Gly-Phe-Leu (**55**) a été préparé par synthèse peptidique sur phase solide (**Schéma 15**).

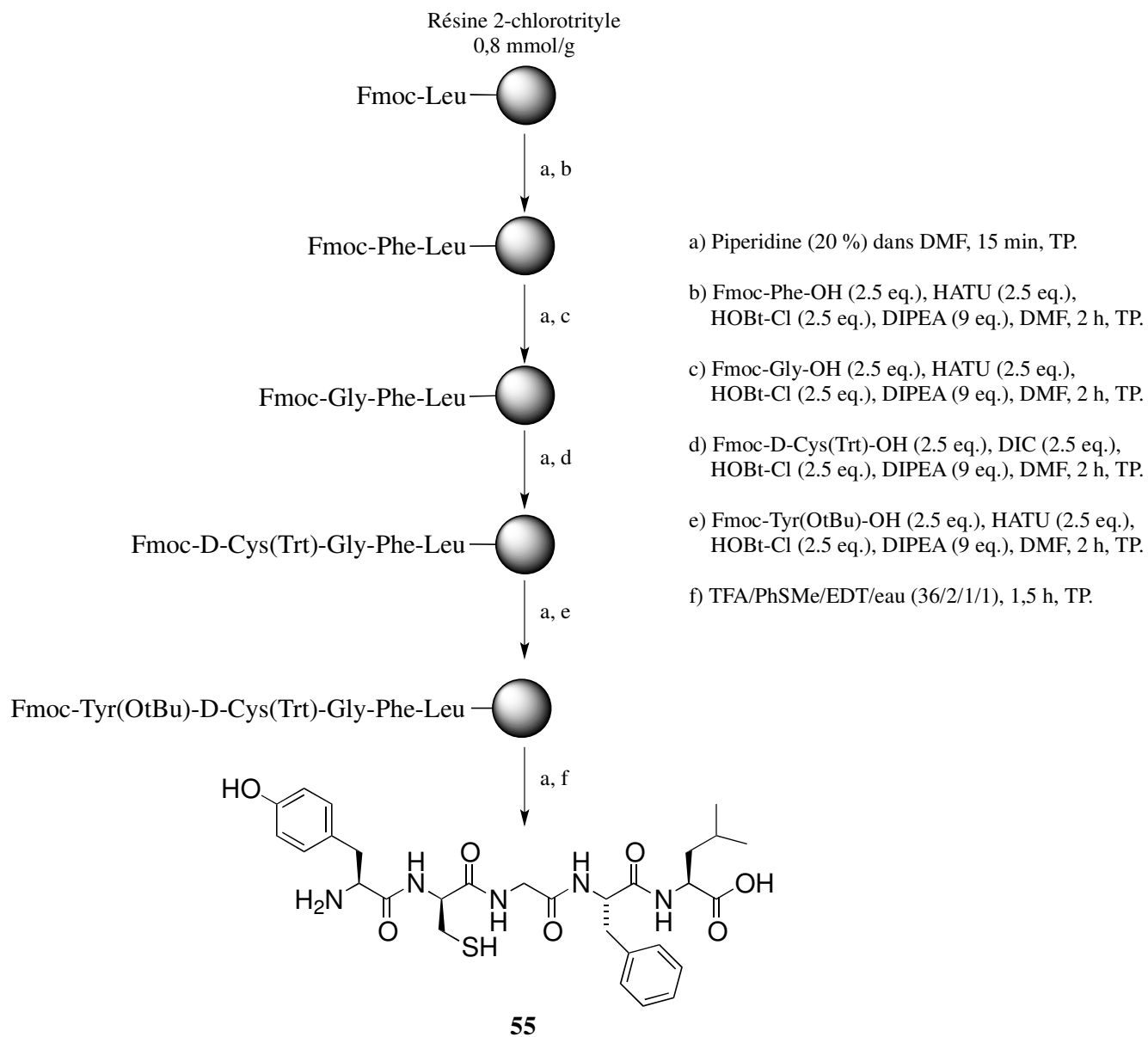
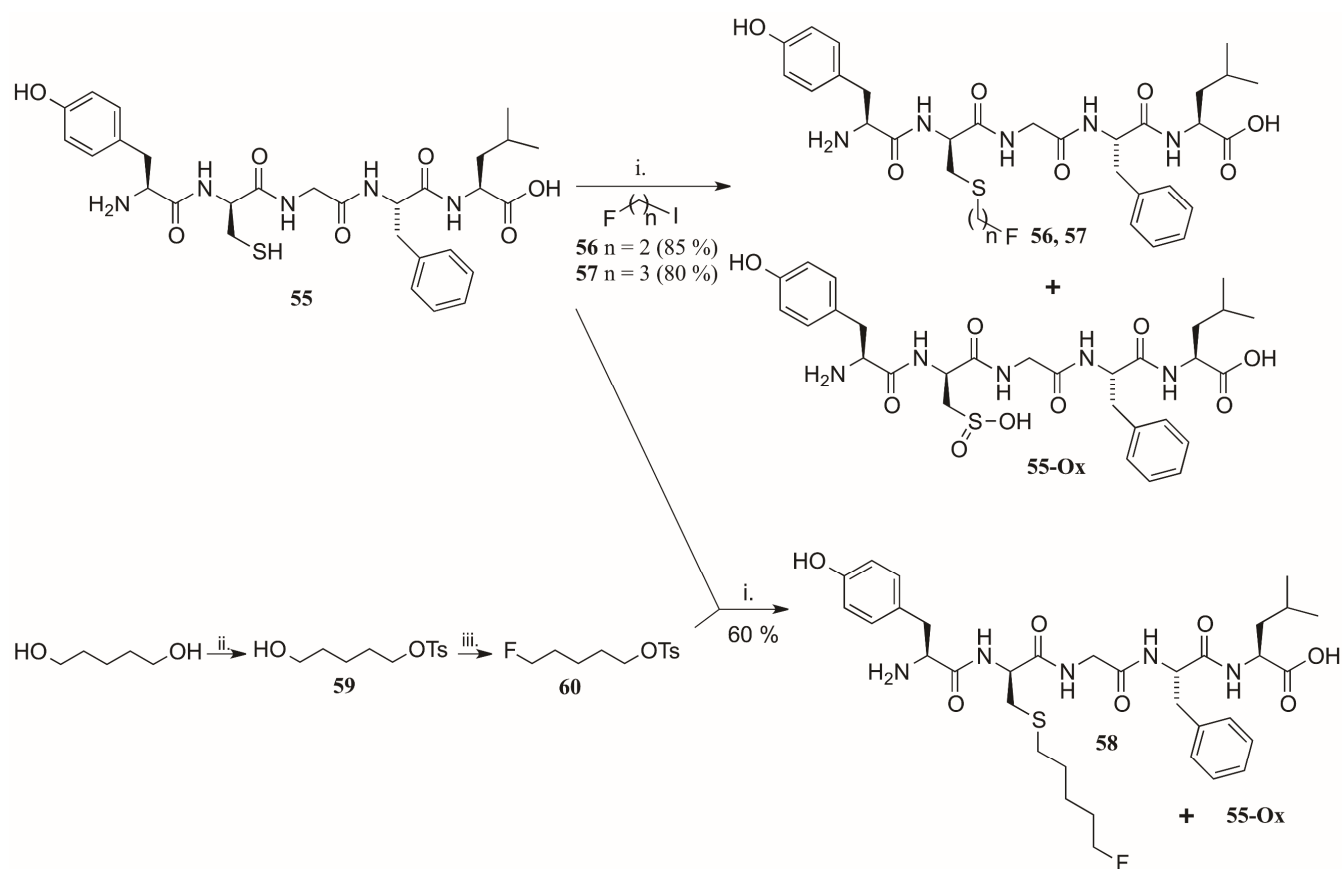


Schéma 15.

Pour le couplage de la cystéine protégée, le réactif DIC a été utilisé à la place du réactif HATU, afin d'éviter la racémisation. Aussi, il est capital de rajouter du thioanisole lors de l'étape de clivage pour limiter la formation de dimères, ainsi que de l'éthanedithiol pour empêcher la recapture du carbocation trityle par le soufre.

Une fois le précurseur **55** obtenu, les différents groupements prosthétiques (motif organique non protéique branché au peptide) portant l'atome de fluor ont été attachés à la cystéine par substitution nucléophile d'ordre 2 (S_N2) (**Schéma 16**). En effet, du fait de la forte nucléophilie de l'atome de soufre, il est possible d'alkyler sélectivement cette position en présence d'une base faible, sans avoir besoin de protéger les autres sites nucléophiles.



i. TMG (4eq.), iodométhane/ 1-fluoro-2-iodoéthane/ 1-fluoro-3-iodopropane / 5-fluoropentyl 4-méthylbenzene sulfonate (1eq.), MeCN, 40 °C, N_2 , 20 min; ii. Tosyl chloride, pyridine, DCM, 24 h, 53%; iii. Diethylaminosulfur trifluoride (DAST), DCM, 24 h, 70 %

Schéma 16.

Dans un premier temps, les conditions de S-alkylation ont été optimisées en utilisant l'iodure de méthyle comme standard (**Tableau 22, entrées 1-8**).

Tableau 22. Conditions de réactions pour la S-alkylation.

Entrée	Base	Solvant	R-X	Produit principal %	Produit secondaire %
1	NaHCO ₃	THF/H ₂ O (1:1)	CH ₃ I (1eq)	40	25
2	NaHCO ₃	CH ₃ CN/H ₂ O (1:1)	CH ₃ I (1eq)	30	2
3	NaHCO ₃	DMF/H ₂ O (1:1)	CH ₃ I (1eq)	75	2
4	DIPEA	THF/H ₂ O (1:1)	CH ₃ I (1eq)	9	12
5	NaHCO ₃	CH ₃ CN/H ₂ O (1:1)	CH ₃ I (2eq)	71	3
6	TMG	THF/H ₂ O (1:1)	CH ₃ I (1eq)	65	17
7	TMG	CH ₃ CN	CH ₃ I (1eq)	88	3
8	TMG	CH ₃ CN	CH ₃ I (3eq)	92	2
9	TMG	CH ₃ CN	F-(CH ₂) ₂ I (3eq)	81	3
10	TMG	CH ₃ CN	F-(CH ₂) ₂ I (5eq)	91	2
11	TMG	CH ₃ CN	F-(CH ₂) ₃ I (5eq) ^b	89	trace
12	TMG	CH ₃ CN	F-(CH ₂) ₅ OTS (5eq) ^b	57	31
13	TMG	CH ₃ CN	F-(CH ₂) ₅ OTS (5eq) ^c	81	19

^aLes rendements correspondent au pic principal en HPLC. Conditions de réactions : Temps : 20 min, (^b50 min ou ^c90 min); base : 4 eq; température : 40 °C; solvant : 100 µL.

Parmi les différentes bases testées (**Tableau 22, entrées 1-6**), la tétraméthylguanidine s'est révélée être le meilleur candidat. De plus, plusieurs systèmes de solvants ont été testés (**Tableau 22, entrées 2, 3, 6, 7**) et l'acétonitrile apparait comme le meilleur solvant. Il a été constaté que l'ajout de 3 équivalents d'iodométhane résultait en une légère amélioration du rendement (**Tableau 22, entrée 8**).

Ces conditions optimisées ont ensuite été appliquées à l'alkylation du 1-fluoro-2-iodométhane et du 1-fluoro-3-iodopropane pour former les composés **56** et **57** (**Schéma 16; Tableau 22, entrées 9-11**). Le

ligand **58** a été produit de façon similaire (**Schéma 16**; **Tableau 22**, entrées **12**, **13**), après préparation du 5-fluoropentyl-4-méthyl-benzène sulfonate **60** en deux étapes depuis le 1,5-pentanediol (**Shéma 16**). La masse du produit secondaire formé dans chaque expérience, semble correspondre au peptide dont la cystéine a été oxydé en acide sulfinique (composé **55-Ox**, **Schéma 16**).

4.3. Propriétés pharmacologiques des composés **55-58**.

4.3.1. Affinité et efficacité cellulaire.

Une fois synthétisés, l'affinité et l'activation des voies signalétiques des composés **55-58** ont été mesurées sur des membranes HEK exprimant sélectivement les récepteurs DOPr et MOPr (**Tableau 23**).

Tableau 23. Affinité et efficacité biologique des composés **56-58**.

Composé	IC ₅₀ ^a DOPr (nM)	IC ₅₀ ^a MOPr (nM)	EC ₅₀ ^b EPAC DOPr (nM)	EC ₅₀ ^b EPAC MOPr (nM)	EC ₅₀ ^b β-arr. DOPr (nM)	EC ₅₀ ^b β-arr. MOPr (nM)
1	1,00 ± 0,28	0,74 ± 0,15	0,10 ± 0,06	9,30 ± 2,58	1,79 ± 0,41	694 ± 190
56	0,50 ± 0,04	0,47 ± 0,09	0,06 ± 0,03	2,85 ± 4,24	0,86 ± 0,43	445 ± 250
57	0,38 ± 0,05	0,70 ± 0,25	0,18 ± 0,19	5,36 ± 12,4	1,15 ± 0,09	689 ± 167
58	1,33 ± 0,32	0,84 ± 0,15	0,30 ± 0,16	15,3 ± 20,3	2,3 ± 0,8	979 ± 275

^aLes valeurs d'IC₅₀ ou d'EC₅₀ sont les moyennes de +/- S.E.M. de 3 à 5 expériences indépendantes. ^bLes valeurs d'EC₅₀ sont les moyennes de +/- S.E.M. de 3 à 5 expériences indépendantes

On peut dès lors constater que les analogues **56** et **57** sont deux fois plus affins sur DOPR que la Leu-Enképhaline **1**. La présence d'une chaîne à 5 carbones dans la molécule **58** semble être également tolérée, malgré une légère diminution de l'affinité.

Concernant l'activation de la voie signalétique AMPc, aucune évolution majeure n'est observée avec des valeurs sensiblement identiques à celle de la Leu-enképhaline, tant pour DOPr que pour MOPr. Une légère baisse de la sélectivité est toutefois observée pour les **56-58** composés synthétisés.

De la même façon, l'activation de la voie signalétique β -arrestine suit la même tendance que la voie précédente pour les deux récepteurs, et ne semble pas perturbée par les modifications en position 2.

4.3.2. Modélisation moléculaire dans le récepteur DOPr.

Les résultats d'affinité et d'efficacité biologique étant obtenus, les trois ligands ont été dockés dans la structure cristallographique 4N6H de DOPr (**Figure 103**).

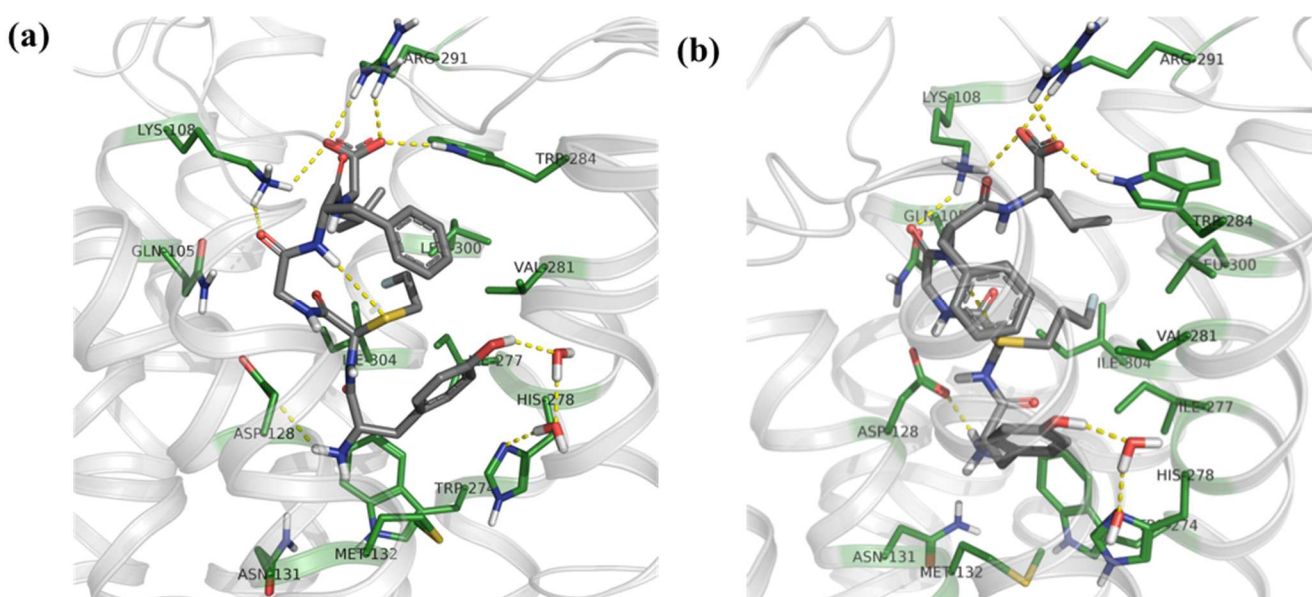


Figure 103. Docking induit (MOE) des peptides **56** (a) et **57** (b) dans la structure cristallographique 4N6H du récepteur DOPr.

Les bonnes propriétés pharmacodynamiques des peptides **56-58** peuvent être expliquées par le positionnement de la chaîne fluoroalcane dans une cavité hydrophobe. Cette poche lipophile est formée par les résidus Ile277, Val281, Leu300, Ile304, sur les hélices transmembranaires TM6 et TM7. Pour les deux premiers peptides, la chaîne est suffisamment petites pour ne pas corrompre le repliement du peptide dans la partie adresse.

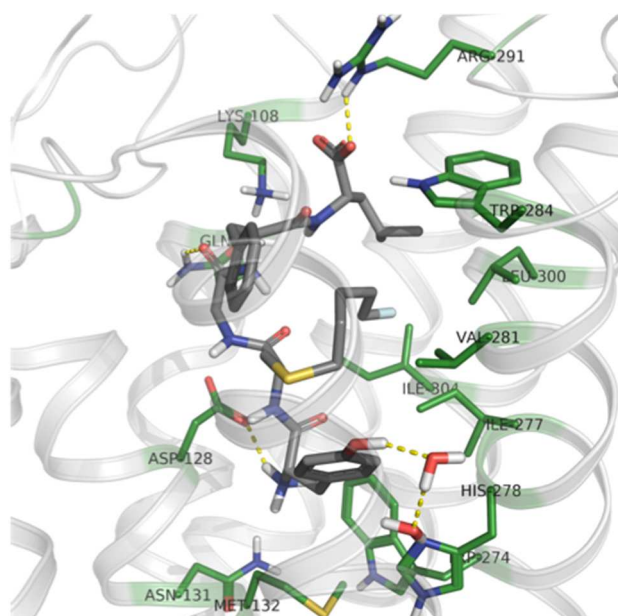


Figure 104. Docking induit (MOE) des peptides **58** dans la structure cristalllographique 4N6H du récepteur DOPr.

Au contraire, la chaîne beaucoup plus imposante du composé **58** semble déstabiliser le coude β formé dans le cas de la Leu-enképhaline et des molécule **56**, **57**, expliquant ici les résultats légèrement inférieurs aux deux autres.

4.3.3. Propriétés pharmacocinétiques des molécules **56-58**.

Notre but ultime étant le développement de radiotraceurs actifs dans le système nerveux central, il est essentiel de s'assurer de leur capacité à traverser la barrière hémato-encéphalique. Pour cela, les valeurs de $\log D_{7,4}$, l'efficacité lipophile, ainsi que les temps de demie vie plasmatique des composés **56-58** ont été mesurés. Les mesures expérimentales ont également été comparées aux valeurs théoriques.

Tableau 24. Valeurs de logD_{7,4} des peptides 56-58

Entrée	logD _{7,4}	ΔlogD _{7,4}	clogD	ΔclogP	LLE	T _{1/2}
1	-0,89	0	-1,86	0	10,9	2 min
56	0,04	0,93	-0,92	0,94	10,2	> 6 h
57	0,36	1,25	-0,70	1,16	9,38	> 6 h
58	0,95	1,84	0,26	2,12	8,57	> 6 h

^aLes valeurs de clogD et de tPSA ont été calculées par la suite logicielle ChemAxon. ^bΔlogD = logD_{composé1}-LogD_{analogue} ^cLLE : Efficacité Lipophile d'un Ligand calculée par la formule LLE = pEC₅₀ - logD_{7,4}.

À notre grand plaisir, une augmentation de la valeur du logD de l'ordre de 1 à 2 unités de log a été constatée pour les composés **56-58**. Les valeurs mesurées sont cohérentes avec celles obtenues par calculs, et le logD augmente linéairement de 0,30 par carbones ajoutés aux ligands.

Le calcul de l'efficacité lipophile des ligands démontre que le gain d'affinité des peptides **56** et **57** est essentiellement lié à leur composante lipophile. La meilleure valeur a été obtenu pour l'analogue **56**. Finalement, un temps de demi-vie supérieur à 6 h a été mesuré pour les trois peptides synthétisés. Ces valeurs combinées à celles du logD laissent présager la viabilité des composés en tant qu'agents actifs dans le SNC.

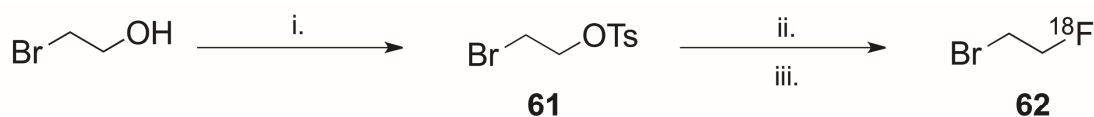
Ainsi, selon les résultats pharmacodynamiques et pharmacocinétiques, les composés **56** et **57** ressortent comme les meilleurs candidats pour la prochaine étape de radiomarquage au ¹⁸F. Nous avons décidé de réaliser les tests dans un premier temps sur le peptide **56**.

4.4. Radiochimie.

Les conditions de bombardement pour la création de l'isotope ¹⁸F sont telles, qu'il est bien entendu impossible de former le produit à même le cyclotron. Le fluor marqué est donc préparé par irradiation de la cible à par partir d'eau enrichie en ¹⁸O, puis il est transféré au laboratoire où il est alors disponible pour des réactions ultérieures.

4.4.1. Synthèse par distillation du ligand prosthétique.

Notre premier objectif consistait à synthétiser le ligand prosthétique **62** radiomarcué au ^{18}F de façon efficace, en s'inspirant de la littérature (**Schéma 17**).³⁷³ Pour cela, l'alcool du 2-bromoéthanol commercial a été activé au préalable sous la forme d'un groupement tosylate. Ce groupe a l'avantage d'activer l'alcool pour l'étape suivante, tout en étant suffisamment stable pour pouvoir le conserver longtemps et en quantité, avant expérience au cyclotron.



i. TsCl (1,2 eq.), pyridine (1,3 eq.), 0°C à TP, 16 h; ii. [^{18}F].F⁻, *o*-DCB, TP, 7 min; iii. 120 °C, N₂, 10 min.

Schéma 17.

L'alcool activé **61** a ensuite été mis à réagir dans le module de synthèse automatique mis au point par Sébastien Tremblay, assistant de recherche chez la professeure Guérin. Ce système a l'avantage de pouvoir gérer la plupart des étapes de la synthèse radiochimique de façon automatisé tout en minimisant l'exposition au radioisotope. Cet appareillage est décrit au **schéma 18**.

Lors du pompage **P1**, l'eau enrichie en ^{18}F est passée à travers une résine composée d'amines quaternaire (**QMA**, *Quaternary Methylammonium*) chargée de piéger les ion fluorures. L'eau résiduelle est ensuite enlevée par distillation azéotropique en présence d'acétonitrile (**V2**), puis une solution de tétraéthylbutyl ammonium dans le méthanol (**V3**) est passée à travers la résine afin d'amener le fluor dans le réacteur (**R5**). Après séchage sous flux positif d'azote, l'ester sulfonique **61** dissous dans l'*ortho*-dichlorobenzene (*o*-DCB) est amené (**V4**) dans le réacteur, où il va réagir avec les ions fluorures à 120 °C. Une fois la réaction terminée, le point d'ébullition du composé **62** (72 °C au lieu de 174 °C pour le composé **61**) est mis à profit, en distillant sélectivement ce dernier à 110 °C sous flux d'azote (**D6**), puis est finalement piégé dans un solvant à l'autre bout de la ligne. Nous avons observé que le DMSO était le solvant le plus efficace pour réaliser cette tâche. Un meilleur rendement a été observé lorsque de l'*o*-DCB était ajouté dans le réacteur avant le séchage azéotropique.

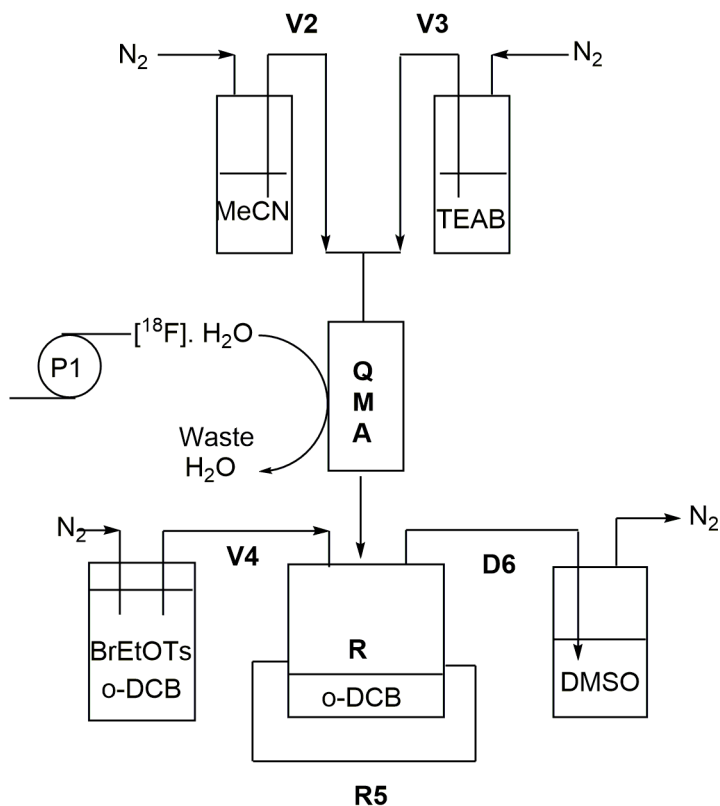


Schéma 18.

Une fois le composé **62** récolté, celui-ci peut être analysé par HPLC équipé d'un détecteur de radioactivité, ou mis à réagir avec le précurseur peptidique **55**. D'après les spectres HPLC obtenus, la conversion semble se passer de façon sélective avec un rendement de 40 %.

Les conditions de radiomarquage du ligand prosthétique étant optimisées, nous voulions trouver un moyen de convertir l'atome de brome en iode afin de pouvoir se placer dans des conditions similaires à celles obtenues pour la synthèse des ligands froids. Pour ce faire, de l'iodure de lithium, LiI, a été ajouté au distillat et la solution a été mise à chauffer à 100 °C pendant 15 minutes. Ces conditions optimisées ont permis une conversion de 60 %, observable en HPLC.

Plusieurs conditions d'alkylations sur le précurseur **55** ont ensuite été tentées (**Schéma 19**, **Tableau 23**).

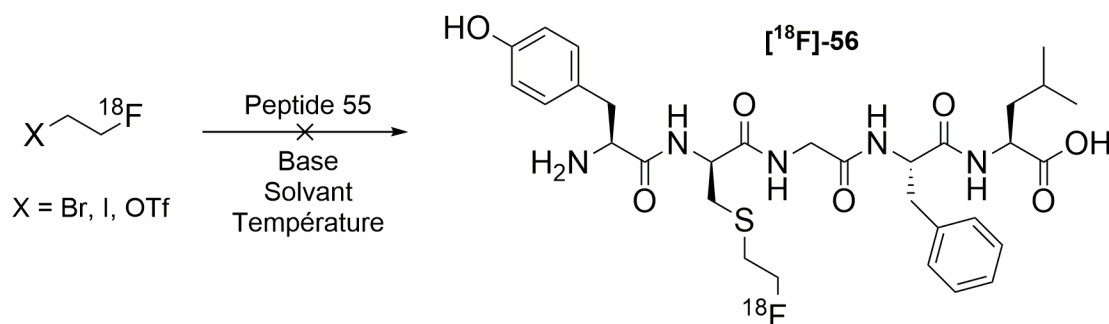


Schéma 19.

Tableau 25. Conditions de réactions pour la S-alkylation du ligand obtenu par distillation.

Entrée	Base	Solvant	X	Température °C	Observations
1	-	THF/H ₂ O (1:1)	I	TP	Pas de réaction
2	NaHCO ₃	THF/H ₂ O (1:1)	I	TP	Pas de réaction
3	TMG	THF/H ₂ O (1:1)	I	TP	Dégradation
4	NaHCO ₃	CH ₃ CN/H ₂ O (1 :1)	I	TP	Pas de réaction
5	NaHCO ₃	CH ₃ CN/H ₂ O (1:1)	I	40	Dégradation
6	NaHCO ₃	DMF/H ₂ O (1:1)	I	TP	Pas de réaction
7	NaHCO ₃	DMSO/H ₂ O (1:1)	I	TP	Pas de réaction
8	-	THF/H ₂ O (1:1)	OTf	TP	Pas de réaction
9	NaHCO ₃	THF/H ₂ O (1:1)	OTf	TP	Pas de réaction
10	TMG	THF/H ₂ O (1:1)	OTf	TP	Dégradation
11	NaHCO ₃	CH ₃ CN/H ₂ O (1 :1)	OTf	TP	Pas de réaction
12	NaHCO ₃	CH ₃ CN/H ₂ O (1:1)	OTf	TP	Dégradation
13	NaHCO ₃	DMF/H ₂ O (1:1)	OTf	TP	Pas de réaction
14	NaHCO ₃	DMSO/H ₂ O (1:1)	OTf	TP	Pas de réaction

^aLes rendements correspondent au pic principal en HPLC. Conditions de réactions : Temps = 20 min (^b50min, ^c90 min); base (4 eq); température (40 °C); solvant : 100 µL (^e400 µL; ^g1000 µL).

La réaction a été tentée en présence ou non de différentes bases (**entrées 1-7**). Malheureusement aucune formation du produit désiré n'a été observée. Dans le cas où la tetraméthylguanidine (TMG) a été utilisée,

des produits de dégradation étaient observables en HPLC. L'utilisation de différents systèmes de solvants, ou l'augmentation de la température n'ont pas permis d'obtenir de meilleurs résultats.

Ainsi, nous avons décidé de changer le nucléofuge par un groupe triflate (**entrées 8-14**). Pour cela, une colonne tapissée de triflate d'argent a été positionnée entre le réacteur et le vial de récolte, afin d'assurer la conversion lors de la distillation du bromure **62**. Aucune amélioration n'a été constatée.

Nous avons alors décidé de nous rapprocher des conditions utilisées lors de la thèse d'Arnaud Proteau-Gagné.²⁴² En effet, au cours de celle-ci, la réaction avait été réalisée dans une boucle HPLC permettant de diminuer la quantité de solvant utilisée et donc d'augmenter la concentration. Ainsi, au moment de la distillation, les vapeurs ont été envoyées dans la boucle HPLC, dans laquelle une solution du peptide **55** avait été introduite au préalable (**Tableau 26**).

Tableau 26. Conditions de réaction pour la S-alkylation du ligand obtenu par distillation dans la boucle HPLC.

Entrée	Base	Solvant	X	Température °C	Rendement ^a
1	-	MeCN	Br	TP	Pas de réaction
2	NaHCO ₃	MeCN	Br	TP	Pas de réaction
3	NaHCO ₃	MeCN	Br	40	Pas de réaction
4	-	MeCN	OTf	TP	Pas de réaction
5	NaHCO ₃	MeCN	OTf	TP	2 %
6	NaHCO ₃	MeCN	OTF	40	Dégradation
7	NaHCO ₃	MeCN/H ₂ O (1:1)	OTf	TP	Pas de réaction

^aLes rendements correspondent au pic principal en HPLC. Conditions de réactions : Temps : 20 min; base : 4 eq; solvant : 100 µL.

La distillation du fluoroéthylbromure n'a pas permis de former l'enképhaline alkylée (**entrées 1-5**). En revanche, nous avons alors eu le plaisir de constater la formation du pic radioactif correspondant au composé souhaité (**entrée 5**), lorsque le triflate était utilisé en tant que groupe partant. Malheureusement, le peu de rendement obtenu ne permettait pas une utilisation pour des tests ultérieurs. L'augmentation de

la température de réaction (**entrée 6**) ou l'ajout d'eau (**entrée 7**) dans le système de solvant, n'as pas permis d'obtenir de meilleurs résultats.

Ces résultats, bien qu'insuffisants, ont permis de souligner l'importance de la concentration, ainsi que du triflate en tant que groupe partant pour la réalisation de cette réaction. La principale limitation de cette dernière approche semble être la difficulté de distiller efficacement le précurseur radiomarké. En effet, il est impossible d'utiliser un flux d'azote trop important au risque de chasser la solution présente dans la boucle HPLC. De plus il est difficile de quantifier la conversion du bromure en triflate.

4.4.2. Synthèse par formation *in situ* du triflate.

Comme mentionné dans la section précédente, le triflate apparaissait comme le nucléofuge le plus adapté pour notre alkylation. Toutefois, la production de ce dernier par distillation semblait être problématique. C'est ainsi que nous avons décidé de changer d'approche. Récemment, Peters *et al.* ont décrit une synthèse efficace de $[^{18}\text{F}]\text{FETOTf}$ à partir d'éthylène sulfite.³⁷⁴ Contrairement à la stratégie précédente, où le ligand fluoré était purifié par distillation, le ligand fluoré a ici été purifié par extraction phase solide (SPE, *solid phase extraction*).

Notre première tâche consistait donc à adapter les conditions décrites par les auteurs de l'article, à notre montage de synthèse automatique (**Schéma 20 et 21**).

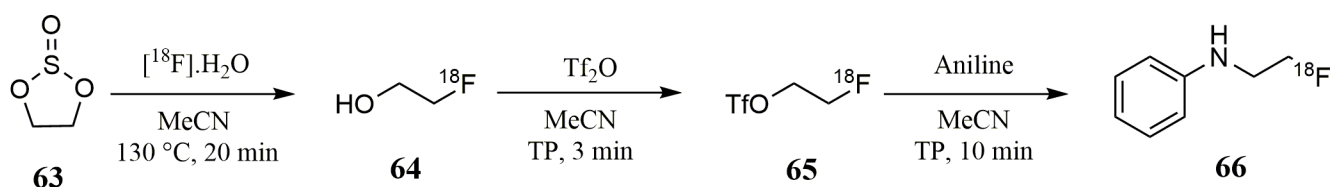


Schéma 20.

De façon similaire à précédemment, le fluor a été pompé (**P1**) depuis le cyclotron jusqu'au montage et piégé sur une colonne **QMA**. Après élimination de l'eau résiduelle par séchage azéotropique (**V2**), le fluor a été transféré dans le réacteur par une solution de TEAB dans le méthanol (**V3**). Le milieu réactionnel a ensuite été concentré, avant l'ajout de l'éthylène sulfite **63** dans l'acétonitrile (**V4**), pour former le 2-fluoroéthanol **64** (**R5**). La solution a ensuite été transférée dans un second réacteur (**V6**)

préchargé avec l'anhydride triflique afin d'activer l'alcool (**R7**). Finalement l'excès d'anhydride triflique a été purifié par passage sur une cartouche d'alumine (**V8**) avant transfert du composé **65** dans le vial de récolte.

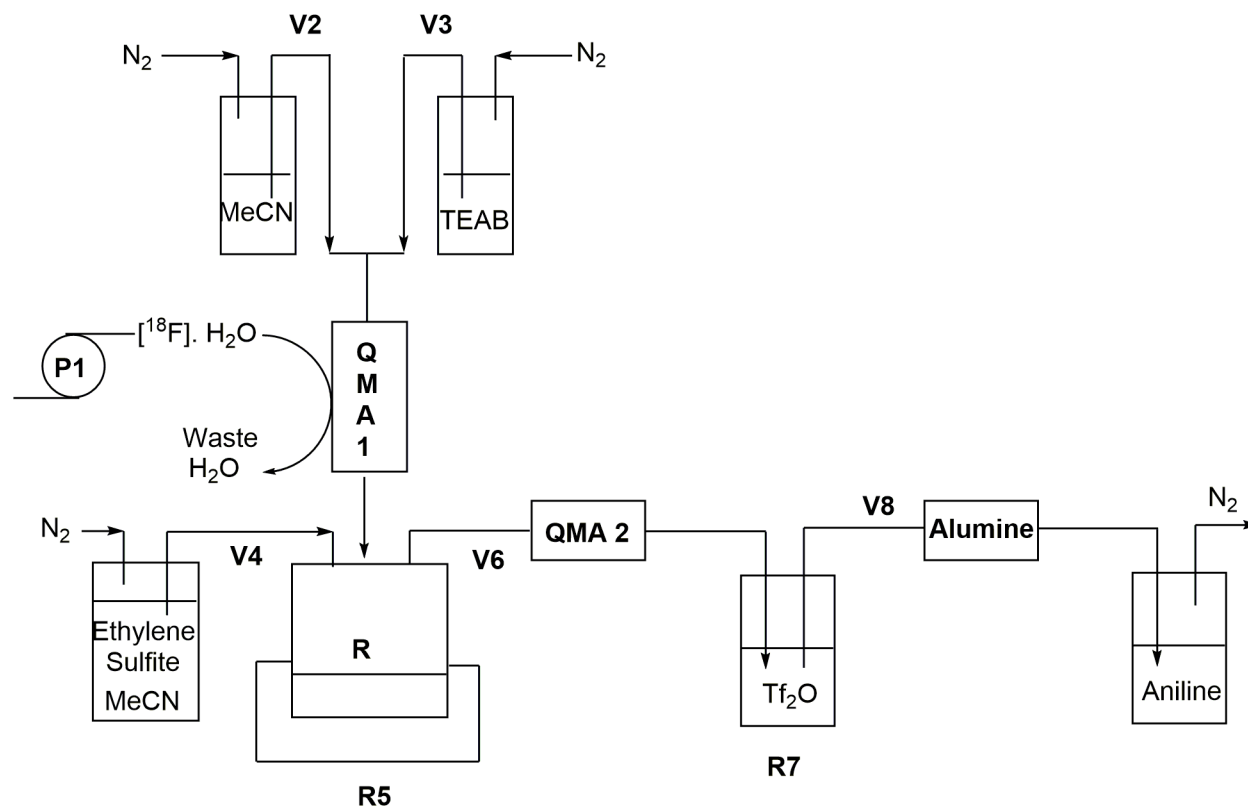


Schéma 21.

Trois équivalents de Tf_2O ont été nécessaires à la conversion totale du composé **64** et **65**, observée en HPLC. En effet, pour la première fois depuis le début de nos expériences, nous avons été capables d'observer un pic correspondant au triflate, confirmant ainsi que les quantités de fluoroéthyltriflate, produites à la section 4.4.1 étaient surement minimes. Comparé aux résultats de Peters *et al.*, un rendement moindre a été obtenu (33% au lieu de 78%).³⁷⁴ Ceci est probablement dû à l'absence de catalyseur de transfert de phase lors de l'étape de fluorination. Ce rendement reste toutefois acceptable. La solution du composé **65** dans l'acétonitrile a ensuite été mis à réagir avec 2,6 équivalents d'aniline à température ambiante, puis purifiée par HPLC semi-préparative. Conformément à nos attentes, une disparition totale du pic correspondant au tosylate a été observée, au profit de la formation d'un nouveau pic à 15 min.

Puisque cette synthèse reproduit les conditions utilisées pour la préparation du ligand froid en deux étapes depuis le fluoroéthanol (**Schéma 22**), nous pouvons affirmer que ce nouveau pic correspondait bien à l'aniline radiomarquée.

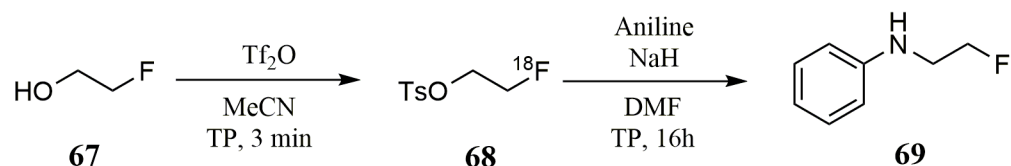


Schéma 22.

Encouragé par ces bons résultats, nous avons logiquement tenté d'appliquer ces conditions à notre précurseur **55** (**Tableau 27**).

Tableau 27. Conditions de réactions pour la S-alkylation du ligand obtenu par SPE.

Entrée	Base	Solvant	Température °C	Rendement ^a
1	-	Acétonitrile	TP	Pas de réaction ^b
2	-	Acétonitrile	40	Pas de réaction ^b
3	NaHCO ₃	Acétonitrile	TP	Pas de réaction ^b
4	NaHCO ₃	Acétonitrile	40	Pas de réaction ^b
5	TMG	Acétonitrile	TP	Dégradation ^b
6	Cs ₂ CO ₃	Acétonitrile	TP	Pas de réaction ^b
7	tBuOK	Acétonitrile	TP	Pas de réaction ^b
8	-	Acétonitrile	TP	Pas de réaction ^c

^aLes rendements correspondent au pic principal en HPLC. Conditions de réactions : Temps : 10 min; base : 4 eq; solvant : 1 mL. Quantité : ^b1,66 μmol de peptide **55**. ^c515 μmol de peptide **55**.

Malheureusement, cela n'a pas eu l'effet escompté (**Tableau 27, entrée 1**). L'ajout de NaHCO₃ ou le chauffage à 40 °C (**Tableau 27, entrées 2-4**) n'ont pas permis d'obtenir de meilleurs résultats. Par la suite, d'autres bases ont été tentées (**Tableau 27, entrées 5-7**), sans aucun effet.

Du fait du peu de peptide en notre possession, seulement 1 mg de peptide était utilisé lors des tests d'alkylations. En y regardant de plus près, nous avons constaté que la molarité mise en jeu était bien

inférieure à celle utilisée lors de la réaction test avec l'aniline (300 fois moindre), et ce, avec la même quantité de solvant. Une fois encore, la concentration semblait critique. Ainsi, la réaction d'alkylation a été tentée à nouveau avec une quantité de peptide suffisante (100 mg) (**Tableau 27, entrée 8**). Encore une fois, aucun produit désiré ne s'est formé. Par manque de temps, aucune expérience ultérieure n'a été réalisée.

4.5. Conclusion.

Au cours de sa thèse, Arnaud Proteau Gagné avait développé un analogue de Leu-enképhaline portant une D-Cystéine méthylée en position 2 (composé **55**). Ce composé s'était démarqué par des propriétés pharmacodynamiques conservées et une augmentation significative de la stabilité et de la lipophilicité. Des travaux supplémentaires avaient entre autres démontré la possibilité de marquer ce composé au ^{11}C . Dans la continuité de ces travaux, nous souhaitons mettre au point un composé proche marqué cette fois au ^{18}F .

Plusieurs dérivés de **55**, portant des chaînes fluoroalcanes de tailles variables (2, 3 et 5 carbones) ont été synthétisées sur phase solide pour la séquence peptidique, puis par synthèse classique pour le branchement des différentes chaînes.

Les tests d'affinité ainsi que les tests de recrutements des voies signalétiques AMPc et β -arrestine sur les récepteurs DOPr et MOPr réalisés par la suite, ont démontré que ce genre de modification ne changeait pas les propriétés pharmacodynamiques de façon significative. Les meilleurs résultats ont été obtenus pour les molécules **56** et **57** comportant respectivement une chaîne à 2 et 3 carbones.

Concernant les propriétés pharmacocinétiques, un gain significatif de lipophilicité (2 unités de log) a été observé et de ce fait une augmentation de leur capacité à traverser la barrière hématoencéphalique pour atteindre les récepteurs opioïdes. Les composés **56** et **57** sont donc apparus comme des candidats viables pour le développement de nouveau radioligands visant le récepteur DOPr pour le diagnostic médical.

Plusieurs efforts de synthèse radiochimique ont alors été réalisés pour le radiomarquage du composé **56**. À notre grande surprise, il nous a été impossible d'obtenir le composé souhaité, malgré les bons résultats pour la synthèse des ligands froids et du fort pouvoir nucléophile du soufre. Il nous a été toutefois

possible d'identifier deux critères essentiels pour la bonne réalisation de cette réaction : L'utilisation du triflate en tant que groupe partant et une concentration élevée. Ainsi, pour mener à bien notre objectif, il faudrait trouver un moyen de diminuer le volume de réaction. Ceci n'est pas aussi simple qu'il n'y paraît. Il est en effet indispensable de conserver les volumes utilisés lors des éluions sur les colonnes SPE, au risque de perdre beaucoup de produit sur celles-ci. Une solution pourrait être d'évaporer une partie de l'acétonitrile en fin de réaction, à l'aide d'un flux d'azote. L'alkylation avec le peptide **55** pourrait ensuite être réalisée en conditions plus concentrée.

Dans l'hypothèse où l'on parviendrait à effectuer l'alkylation, et que de bons résultats soient obtenues lors des tests d'autoradiographie, il est raisonnable de penser que la lipophilicité du radiotraceur ne soit pas encore suffisante pour se rendre dans le cerveau. Dans ce cas, il serait intéressant de combiner l'alkylation en position 2 avec les modifications étudiées au cours des chapitres 1 et 2, et d'étudier leur compatibilité (**Figure 105**).

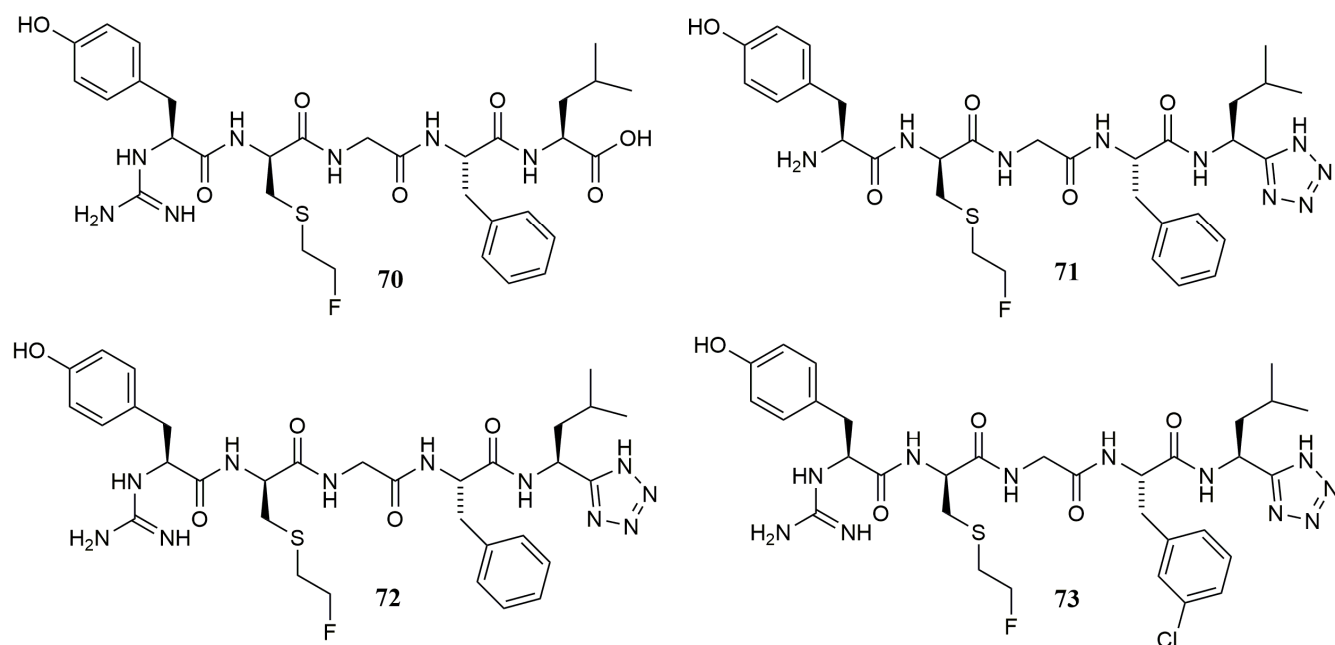


Figure 105. Structures chimiques des composés **70-73**.

Récemment, l'équipe du professeur Britton a mis au point un procédé permettant la fluorination d'alcane non-activés et notamment sur la chaîne latérale d'acides aminés non protégés tels que la valine ou la leucine.³⁷⁵ La méthodologie décrite se passe en conditions radicalaires et nécessite un alcane tertiaire pour

la stabilisation du radical. Ainsi, il serait intéressant de mettre à profit une telle stratégie sur la Leu-Enképhaline (**74**), ou sur une version modifiée du peptide **55** (**75**) (**Figure 106**).

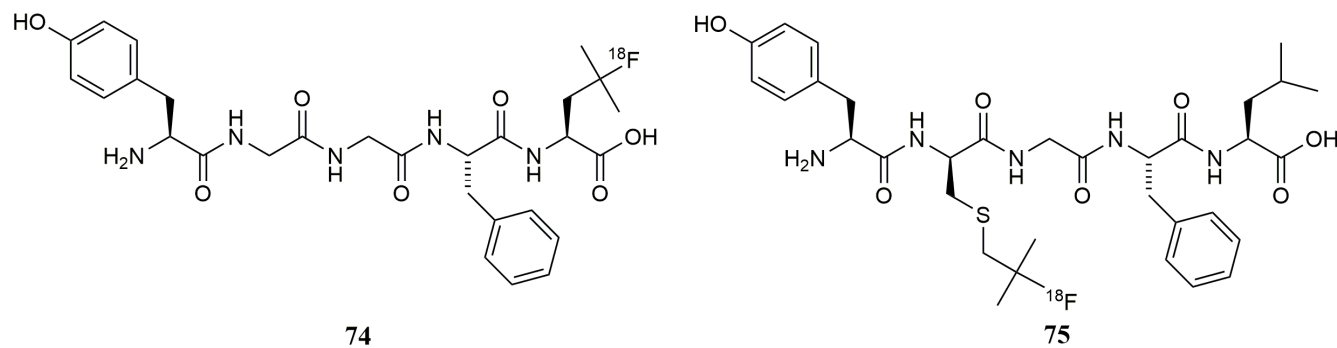


Figure 106. Structures chimiques des composés **74** et **75**.

CONCLUSION GÉNÉRALE

Le traitement de la douleur est malheureusement encore un domaine thérapeutique qui n'a toujours pas été parfaitement comblé. La plupart des drogues utilisées en clinique sont caractérisées par un manque d'efficacité et/ou associées à de nombreux effets secondaires. Du fait de son panel d'effets secondaires réduit, le récepteur opioïde DOPr laisse entrevoir le développement de molécules plus sécuritaires pour le traitement de la douleur sur le long terme. Aussi, la Leu-enképhaline et d'autres ligands endogènes de ce récepteur apparaissent comme des modèles intéressants. Malgré leur efficacité, leur utilisation est limitée par leur mauvaises propriétés pharmacocinétiques. De nombreuses modifications ont d'ores et déjà été proposées par les grands noms de ce domaine. Ainsi, nous souhaitons apporter notre pierre à l'édifice. Les travaux effectués antérieurement au laboratoire avaient souligné l'importance de la modification des liaisons amides par des fonctions isostères, ou de la chaîne latérale en position 5 de la Leu-enképhaline. En outre, ces premiers résultats, avaient permis la proposition d'un modèle actif de la Leu-enképhaline dans le récepteur DOPr. La **figure 107** illustre les différentes modifications étudiées dans cet ouvrage.

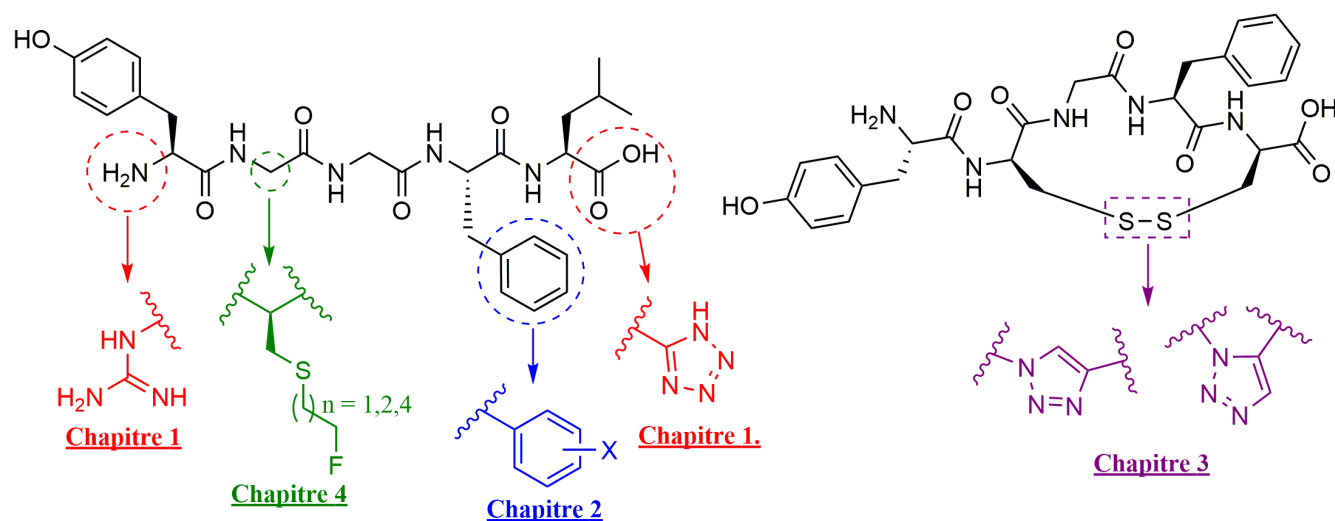


Figure 107. Résumé des travaux effectués au cours de cette thèse.

Au cours du premier chapitre, les positions C-terminale et N-terminale, responsables en grande partie de la forte polarité et de la mauvaise stabilité plasmatique ont été tour à tour remplacées par un tétrazole et un guanidyle. Ces fonctions isostères ont été choisies pour leur potentielle habilité de conserver les

interactions moléculaires clés avec le récepteur, tout en augmentant la lipophilicité et la stabilité plasmatique, en empêchant la reconnaissance des sites de clivages par les protéases. Ces altérations ont ensuite été testées en combinaison sur la Leu-énképhaline ou sur le DADLE. Conformément à notre hypothèse, ces modifications n'ont pas perturbé l'affinité ou l'efficacité biologique des molécules, conduisant à des valeurs proches du peptide parent. Une amélioration a même été constatée pour certaines d'entre elles (composés **4** et **13**, **Figure 108**). Concernant les propriétés pharmacocinétiques, nous avons eu le plaisir de constater que l'ajout d'un guanidyle à la place de l'ammonium (composé **4**) permettait d'augmenter le temps de demi-vie à 15 min (au lieu de 2 min pour la Leu-énképhaline). La modification en C-terminale n'a eu aucune influence sur ce paramètre (composé **2**). Les résultats les plus spectaculaires ont été obtenus pour les molécules **5** et **8**, avec une stabilité plasmatique supérieure à 6 h. La molécule **8** s'est également démarquée par une valeur de logD de 0,53, soit un gain de deux unités de log. La molécule **13** obtenue par hasard au cours de nos expériences, c'est révélé également intéressante. Bien que l'aspect imposant du noyau pyridyl ait pu laisser craindre une conversion du ligand en antagoniste, il a, au contraire, préservé le coté agoniste tout en améliorant de l'affinité et de la sélectivité pour DOPr.

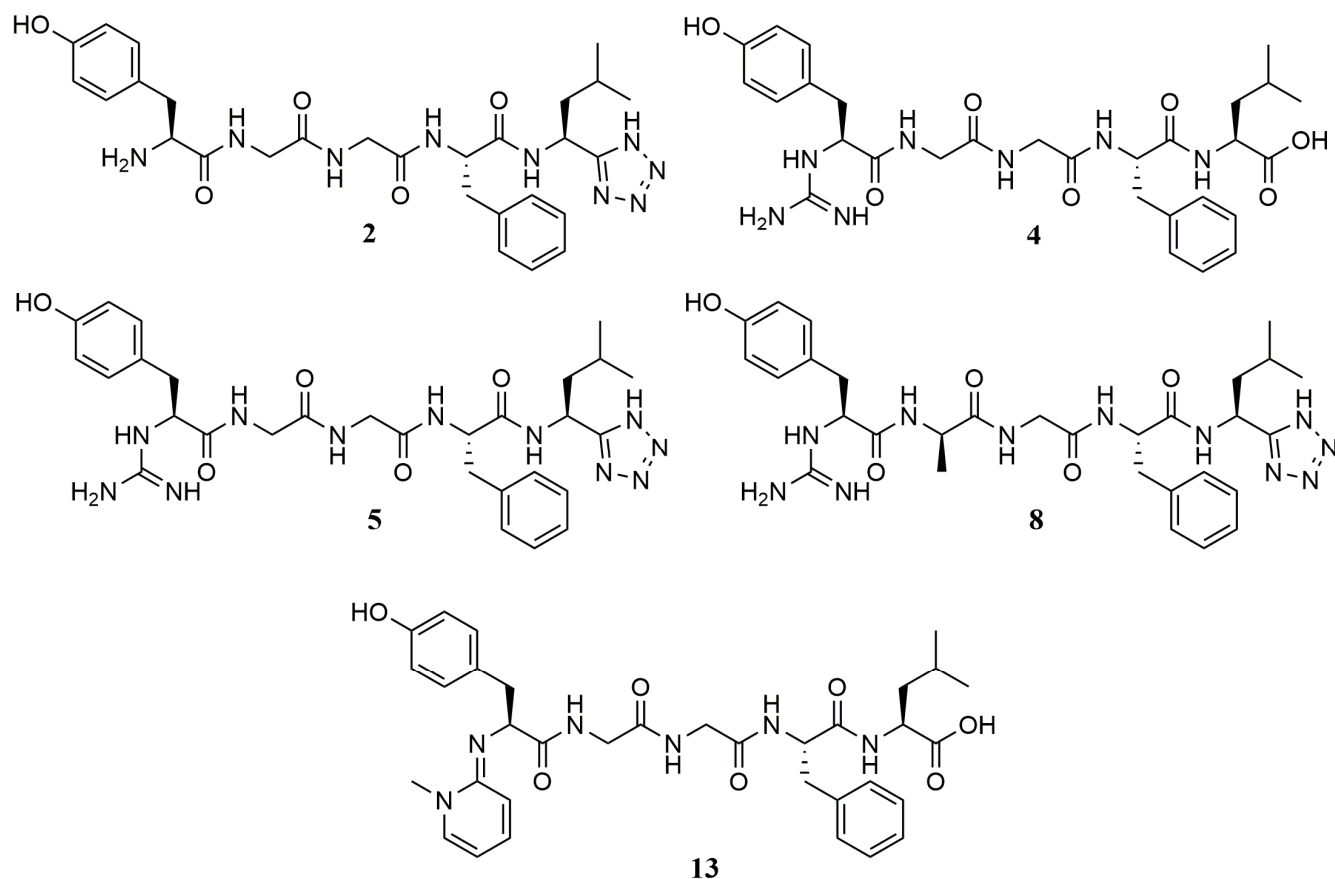


Figure 108. Molécules d'intérêt issues du chapitre 1.

Ainsi par cette étude, nous avons démontré que le remplacement simultané de chaque extrémité de la Leu-enképhaline était une stratégie viable pour l'amélioration de son profil pharmacocinétique tout en conservant ses propriétés pharmacodynamiques.

Au chapitre 2, nous nous sommes intéressés à l'influence de la substitution du noyau aromatique sur la phénylalanine en position 4. Bien qu'il soit admis que ce résidu contribue à la sélectivité entre les différents récepteurs opioïdes, son positionnement dans le récepteur DOPr est encore sujet à controverse. Plusieurs modifications sur cette position avaient déjà été décrites dans la littérature, cependant aucune approche rationnelle n'avait encore été réalisée. C'est donc la tâche à laquelle nous nous sommes attelés, en nous aidant pour cela de l'arbre décisionnel de Topliss. La plupart des composés synthétisés ont conservé des valeurs d'affinité et d'efficacité similaires à la Leu-enképhaline, confirmant la forte latitude de ce résidu. Des variations de sélectivité pour DOPr ont toutefois été observées. La série d'analogues comportant un halogène en position 3 (composés **26**, **30** et **31**) du cycle aromatique s'est toutefois démarquée (**Figure 109**), en particulier le peptide **26**. Les travaux de docking induit sur ces composés ont révélé que l'halogène en cette position serait potentiellement capable de former une liaison halogène bénéfique avec le carbonyl de Trp284 pour la liaison des ligands dans le récepteur.

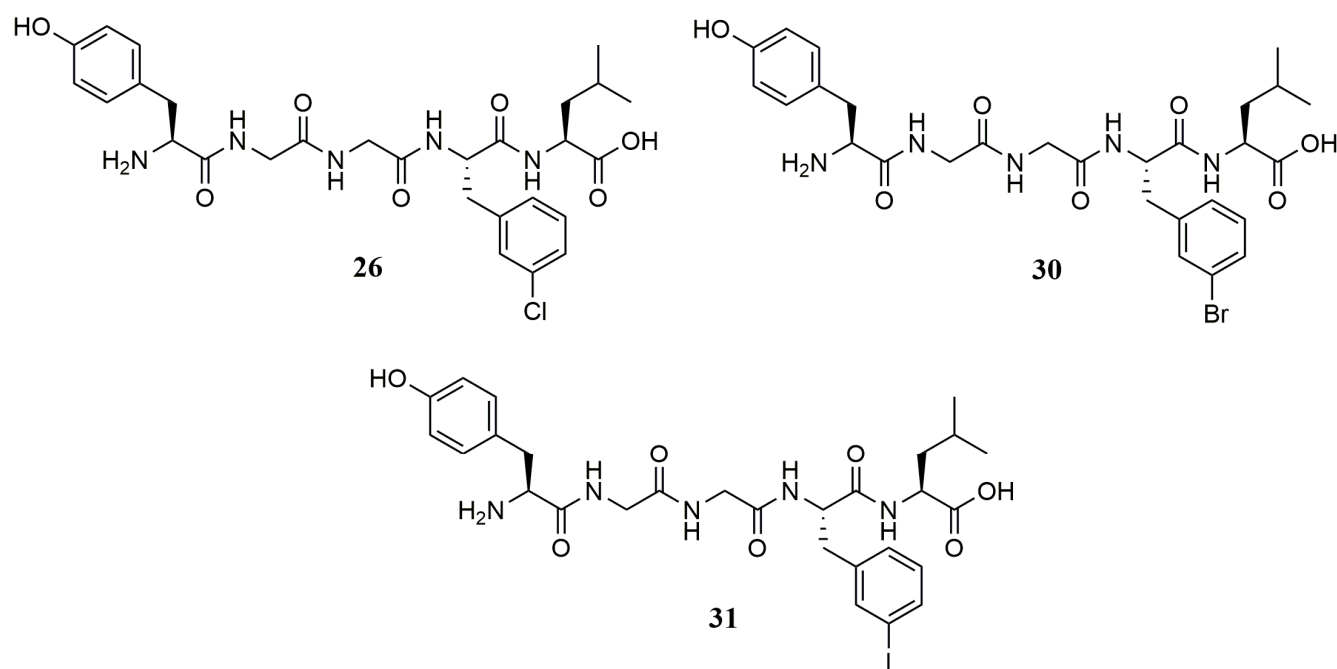


Figure 109. Molécules d'intérêt issues du chapitre 2.

De ces travaux de modélisation, se sont aussi dégagés plusieurs tendances de positionnement du noyau aromatique en fonction des groupements présents. Tandis que les groupements lipophiles semblent induire un positionnement vers le bas du récepteur, les substituants polaires dirigent quant à eux le noyau aryle vers une poche hydrophile en haut du récepteur. De façon intéressante, ces tendances suivent l'évolution de la sélectivité, confirmant l'hypothèse qu'une position du groupe phényle (de la phénylalanine), proche de la tyrosine favorise la sélectivité. De ce fait, ces travaux nous ont permis de proposer des éléments de réponse sur le comportement du résidu Phe⁴ dans le récepteur DOPr, ainsi que la découverte de l'effet bénéfique d'un halogène en position 3 du noyau aromatique.

Une autre approche souvent utilisée en chimie médicinale pour l'optimisation de candidats médicaments est la macrocyclisation. De nombreux macrocycles inspirés de ligands endogènes opioïdes ont été mis au point au cours des trente dernières années, mais peu d'entre eux sont réellement sélectifs à DOPr. Parmi eux, le DPDPE et le JOM-13 sont particulièrement intéressants. Toutefois, la présence d'un pont disulfure sur leur structure, à cause de son instabilité métabolique possible, est problématique. Ainsi nous avons proposé dans le troisième chapitre, de remplacer ce pont disulfure par une fonction triazole, supposée conserver l'intégrité structurelle des macrocycles mentionnés. Aidé par la méthodologie de chimie click en phase solide, plusieurs analogues portant soit un 1,4-triazole ou un 1,5-triazole (dépendamment du catalyseur utilisé) ont été synthétisés (**Figure 110**). De ces molécules, seuls les composés dérivés du DPDPE (**41** et **42**) ont produits des résultats intéressants. Là où le remplacement par un 1,4-triazole (**41**) provoque une nette préférence pour MOPr, l'ajout d'un 1,5-triazole (**42**) permet de réduire cette tendance.

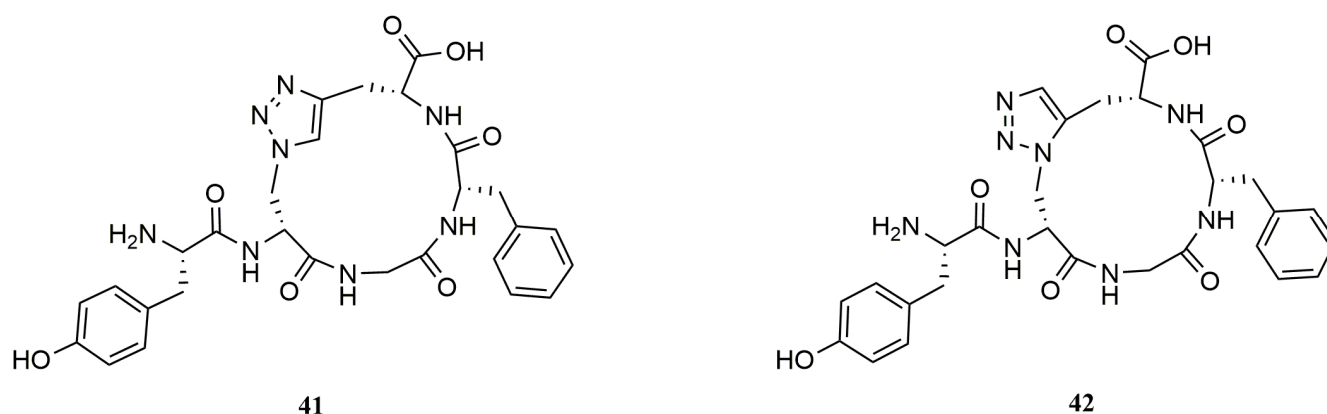


Figure 110. Molécules d'intérêt issues du chapitre 3.

Bien que les que ces macrocycles ne soient pas sélectifs à DOPr, la preuve a été faite que cette stratégie pourrait permettre de remplacer le pont disulfure, tout en s'appuyant sur la simplicité de la chimie click. De plus, les quelques calculs effectués par la suite, ont mis en lumière quelques paramètres qui pourraient permettre d'améliorer tant l'affinité que la sélectivité pour DOPr de ces peptides macrocycliques.

En complément des travaux initiés par Arnaud Proteau Gagné, la position 2 de la Leu-Enképhaline a été explorée plus en profondeur durant le chapitre 4. Ce projet mené en collaboration avec l'équipe de la professeure Brigitte Guérin, a permis de mettre en évidence la compatibilité de longues chaînes alcanes fluorées sur cette position (**Figure 111**). En effet, l'ajout d'une chaîne à deux carbones (**56**) ou à trois carbones (**57**), n'as pas eu d'influence majeure tant pour l'affinité que pour l'activations des voies de signalisations. En revanche, ces modifications ont permis d'améliorer significativement la lipophilicité (logD) et la stabilité de ces molécules (> 6h). Cette compatibilité de ces chaînes alcanes en position 2 pourrait être expliquée par leur capacité à remplir une grosse poche hydrophobe du récepteur DOPr.

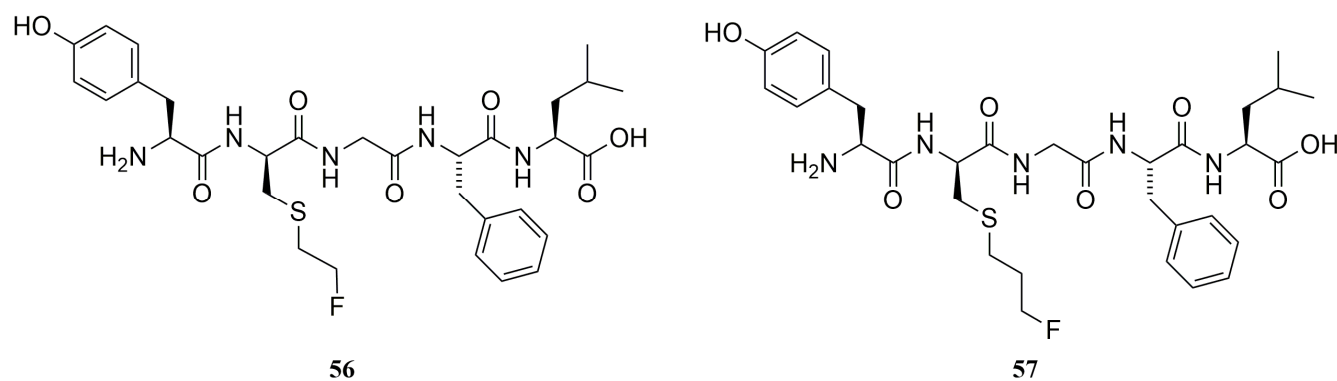


Figure 111. Molécules d'intérêt issues du chapitre 4.

Dans la deuxième partie de ce chapitre, plusieurs efforts de radiomarquage de la molécule **56** ont été tentés, sans succès. Nous avons cependant été capables de produire efficacement les ligands prosthétiques marqués au ¹⁸F. De plus, plusieurs paramètres clés ont été identifiés pour la réussite d'une telle manœuvre, comme l'utilisation de triflate en tant que groupe partant, lors de la réaction d'alkylation. Il est également nécessaire de se placer à forte concentration. La prochaine étape devra donc se concentrer sur ces problématiques techniques.

Ainsi, les résultats de cette thèse apportent des informations précieuses pour notre compréhension du mode de liaisons des ligands peptidiques dans le récepteur DOPr, ainsi que l'optimisation de leurs propriétés pharmacocinétiques pour en faire de meilleurs candidats médicaments. Le combat contre la douleur est ardu, mais sur le long terme, la mutualisation des connaissances apportées par notre groupe et les autres acteurs du domaine permettront le développement de traitements efficaces plus sécuritaires.

Concernant nos travaux, plusieurs suggestions de perspectives ont d'ores et déjà été proposées à la fin de chaque chapitre, mais il me semble essentiel de faire une synthèse de celles-ci. La prochaine étape logique serait donc d'étudier la combinaison des modifications effectuées au cours des différents chapitres de cette ouvrage, mais aussi de celles obtenus par mes prédécesseurs. Dans l'hypothèse où ces combinaisons seraient additives, voir synergiques, un composé stable, capable de traverser la BHE et sélectif à DOPr pourrait voir le jour. Plusieurs exemples non exhaustifs sont listés en **figure 112**.

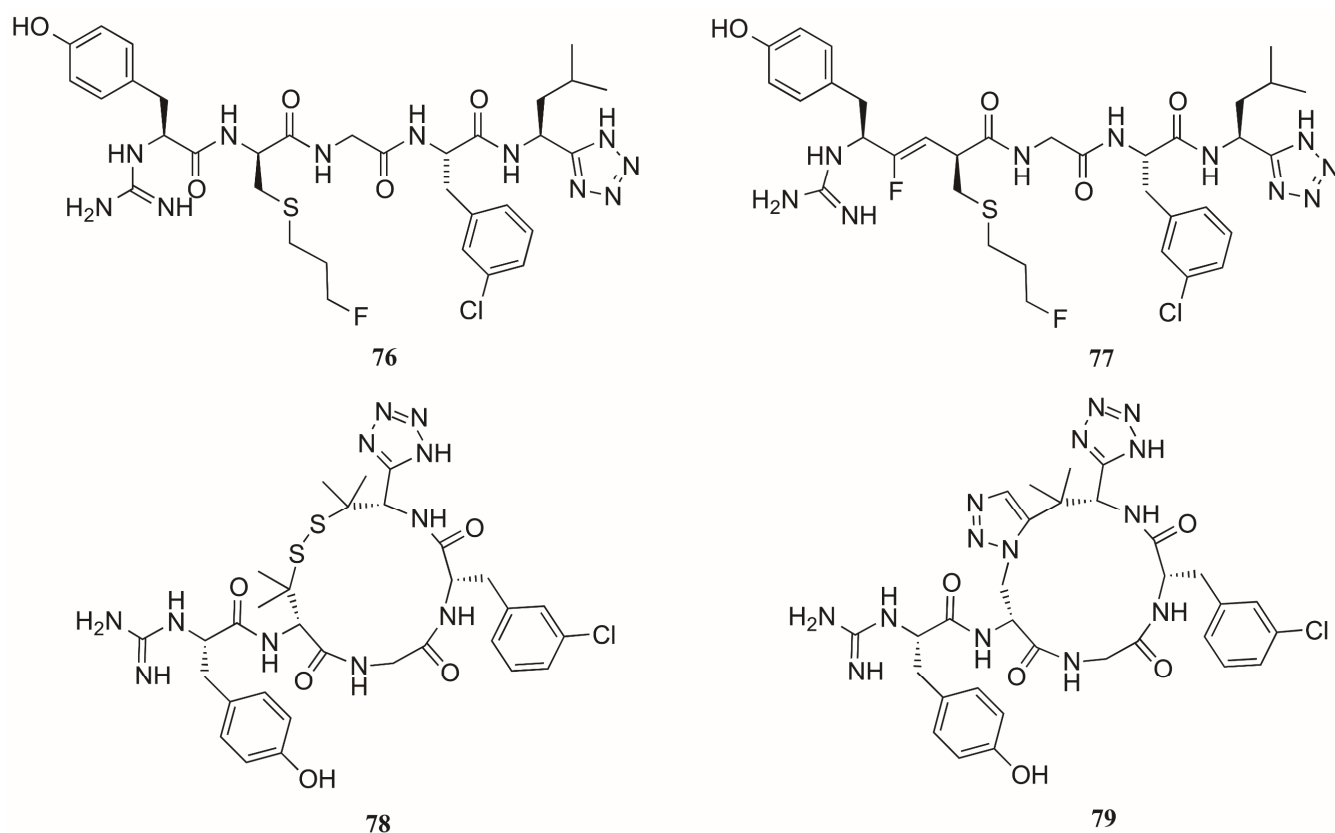


Figure 112. Exemples de combinaisons possibles.

La molécule **76** regroupe le tétrazole et la guanidine issues du chapitre 1, la chaîne alcane du chapitre 3 et le chlore en position 3 de la phénylalanine du chapitre 2. Structurellement proche, le composé **77** voit sa première liaison amide remplacé par un fluoroalcène. L'analogie **78**, quant à lui est un dérivé du macrocycle DPDPE, auquel a été ajouté un groupe tétrazole et un groupe guanidyle à chaque extrémité, ainsi qu'un chlore en position 3 de la phénylalanine. Finalement le composé **79** est une version modifiée du composé **47** proposé à la fin du chapitre 3.

RÉFÉRENCES ET NOTES

- ¹ Lorin, F. La douleur dans la Grèce antique. *Douleur Analgésie* **2005**, 18 (1), 9–11.
- ² Flahaut, J. Les Derosne, pharmaciens parisiens, de 1779 à 1855. *Rev. Hist. Pharm.* **2005**, 93 (346), 221–234
- ³ Yvarel, J.-J. La morphinée. *Communications* **1993**, 56 (1), 105–113
- ⁴ Management of Terminal Illness: First published by Hospital Medicine Publications Ltd (1967), pp. 1–29, London. - Oxford Scholarship <http://www.oxfordscholarship.com/view/10.1093/acprof:oso/9780198570530.001.0001/acprof-9780198570530-chapter-16> (accessed Oct 23, 2017)
- ⁵ Gulland, J. M.; Robinson, R. CXII.—The Morphine Group. Part I. A Discussion of the Constitutional Problem. *J. Chem. Soc. Trans.* **1923**, 123 (0), 980–998.
- ⁶ Gates, M.; Tschudi, G. The Synthesis of Morphine. *J. Am. Chem. Soc.* **1956**, 78 (7), 1380–1393
- ⁷ 9789210481199: Narcotic Drugs: Estimated World Requirements for 2008 (Statistics for 2006) (Multilingual Edition) - AbeBooks - United Nations: 9210481194 <https://www.abebooks.co.uk/9789210481199/Narcotic-Drugs-Estimated-World-Requirements-9210481194/plp> (accessed Oct 23, 2017).
- ⁸ Editorial The Need of a Taxonomy. *PAIN* **1979**, 6 (3), 247
- ⁹ Symposium, N. N. G. (Great B. *The Neurobiology of Pain: Symposium of the Northern Neurobiology Group, Held at Leeds on 18 April, 1983*; Manchester University Press, 1984.
- ¹⁰ Loeser, J. D.; Treede, R.-D. The Kyoto Protocol of IASP Basic Pain Terminology☆. *PAIN* **2008**, 137 (3), 473.
- ¹¹ Huskisson, E. C. Measurement of Pain. *J. Rheumatol.* **1982**, 9 (5), 768–769
- ¹² Greenberg, E. N. The Consequences of Chronic Pain. *J. Pain Palliat. Care Pharmacother.* **2012**, 26 (1), 64–67.
- ¹³ Classification of Chronic Pain. Descriptions of Chronic Pain Syndromes and Definitions of Pain Terms. Prepared by the International Association for the Study of Pain, Subcommittee on Taxonomy. *Pain. Suppl.* **1986**, 3, S1-226
- ¹⁴ Pruimboom, L.; van Dam, A. C. Chronic Pain: A Non-Use Disease. *Med. Hypotheses* **2007**, 68 (3), 506–511

- 15 Holmes, D. The Pain Drain. *Nature* **2016**, 535 (7611), S2–S3.
- 16 Weiner, S. G.; Malek, S. K.; Price, C. N. The Opioid Crisis and Its Consequences. *Transplantation* **2017**, 101 (4), 678.
- 17 Canon, F. Physiologie des systèmes intégrés, les principes et fonctions - Le réflexe de flexion est polysynaptique http://ressources.unisciel.fr/physiologie/co/grain_3_4_2.html.
- 18 Carlton, S. M.; Coggeshall, R. E. Nociceptive Integration: Does It Have a Peripheral Component? *Pain Forum* **1998**, 7 (2), 71–78
- 19 Basbaum, A. I.; Bautista, D. M.; Scherrer, G.; Julius, D. Cellular and Molecular Mechanisms of Pain. *Cell* **2009**, 139 (2), 267–284.
- 20 Mc Gill University. LES VOIES ASCENDANTES DE LA DOULEUR http://lecerveau.mcgill.ca/flash/a/a_03/a_03_cl/a_03_cl_dou/a_03_cl_dou.html
- 21 Urban, L.; Thompson, S. W. N.; Dray, A. Modulation of Spinal Excitability: Co-Operation between Neurokinin and Excitatory Amino Acid Neurotransmitters. *Trends Neurosci.* **1994**, 17 (10), 432–438.
- 22 Dickenson, A. H. Spinal Cord Pharmacology of Pain. *Br. J. Anaesth.* **1995**, 75 (2), 193–200.
- 23 Jessell, T. M. The Role of Substance P in Sensory Transmission and Pain Perception. *Adv. Biochem. Psychopharmacol.* **1981**, 28, 189–198.
- 24 Rang, H. P.; Ritter, J. M.; Flower, R. J.; Henserson, G. Analgesic Drugs. In *Rang & Dales's Pharmacology*; Elsevier; pp 509–529.
- 25 Bouhassira, D.; Lantéri-Minet, M.; Attal, N.; Laurent, B.; Touboul, C. Prevalence of Chronic Pain with Neuropathic Characteristics in the General Population. *Pain* **2008**, 136 (3), 380–387.
- 26 Vaillancourt, P. D.; Langevin, H. M. Painful Peripheral Neuropathies. *Med. Clin. North Am.* **1999**, 83 (3), 627–642, vi
- 27 Foley, P. L.; Vesterinen, H. M.; Laird, B. J.; Sena, E. S.; Colvin, L. A.; Chandran, S.; MacLeod, M. R.; Fallon, M. T. Prevalence and Natural History of Pain in Adults with Multiple Sclerosis: Systematic Review and Meta-Analysis. *Pain* **2013**, 154 (5), 632–642.
- 28 Portenoy, R. K. Painful Polyneuropathy. *Neurol. Clin.* **1989**, 7 (2), 265–288.
- 29 Dworkin, R. H. An Overview of Neuropathic Pain: Syndromes, Symptoms, Signs, and Several Mechanisms. *J. Pain* **2002**, 18 (6), 343–349.
- 30 Dworkin, R. H.; O'Connor, A. B.; Backonja, M.; Farrar, J. T.; Finnerup, N. B.; Jensen, T. S.; Kalso, E. A.; Loeser, J. D.; Miaskowski, C.; Nurmikko, T. J.; et al. Pharmacologic Management of Neuropathic Pain: Evidence-Based Recommendations. *Pain* **2007**, 132 (3), 237–251

- 31 Besson, J. M. The Neurobiology of Pain. *Lancet Lond. Engl.* **1999**, 353 (9164), 1610–1615.
- 32 Latremoliere, A.; Woolf, C. J. Central Sensitization: A Generator of Pain Hypersensitivity by Central Neural Plasticity. *J. Pain Off. J. Am. Pain Soc.* **2009**, 10 (9), 895–926
- 33 Mifflin, K. A.; Kerr, B. J. The Transition from Acute to Chronic Pain: Understanding How Different Biological Systems Interact. *Can. J. Anaesth. J. Can. Anesth.* **2014**, 61 (2), 112–122
- 34 Raffa, R. B.; Pergolizzi, J. V.; Tallarida, R. J. The Determination and Application of Fixed-Dose Analgesic Combinations for Treating Multimodal Pain. *J. Pain* **2010**, 11 (8), 701–709
- 35 WHO | WHO's cancer pain ladder for adults <http://www.who.int/cancer/palliative/painladder/en/> (accessed Oct 23, 2017).
- 36 Hersh, E. V.; Moore, P. A.; Ross, G. L. Over-the-Counter Analgesics and Antipyretics: A Critical Assessment. *Clin. Ther.* **2000**, 22 (5), 500–548.
- 37 Machado, G. C.; Maher, C. G.; Ferreira, P. H.; Day, R. O.; Pinheiro, M. B.; Ferreira, M. L. Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs for Spinal Pain: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Ann. Rheum. Dis.* **2017**, 76 (7), 1269–1278.
- 38 Green, G. A. Understanding NSAIDs: From Aspirin to COX-2. *Clin. Cornerstone* **2001**, 3 (5), 50–60
- 39 Rang, H. P.; Ritter, J. M.; Flower, R. J.; Henserson, G. Anti-Inflammatory and Immunosuppressant Drugs. In *Rang & Dale's Pharmacology*; Elsevier, 2016; pp 317–334.
- 40 Devillier, P. Pharmacologie Des Anti-Inflammatoires Non-Stéroïdiens et Pathologies ORL. *Presse Médicale* **2001**, 30 (39–40), 70–79.
- 41 Brune, K.; Hinz, B. The Discovery and Development of Antiinflammatory Drugs. *Arthritis Rheum.* **2004**, 50 (8), 2391–2399.
- 42 Loder, E.; Rizzoli, P. Tension-Type Headache. *BMJ* **2008**, 336 (7635), 88–92.
- 43 Bartfai, T.; Conti, B. Fever. *ScientificWorldJournal* **2010**, 10, 490–503.
- 44 Munir, M. A.; Enany, N.; Zhang, J.-M. Nonopioid Analgesics. *Anesthesiol. Clin.* **2007**, 25 (4), 761–774.
- 45 Zimmerman, H. J. Effects of Aspirin and Acetaminophen on the Liver. *Arch. Intern. Med.* **1981**, 141 (3), 333–342.
- 46 Macdonald, S. Aspirin Use to Be Banned in under 16 Year Olds. *BMJ* **2002**, 325 (7371), 988.
- 47 Prescott, L. F. Paracetamol: Past, Present, and Future. *Am. J. Ther.* **2000**, 7 (2), 143–147.
- 48 Bonnefont, J.; Courade, J.-P.; Alloui, A.; Eschalier, A. [Antinociceptive mechanism of action of paracetamol]. *Drugs* **2003**, 63 Spec No 2, 1–4.

- 49 Aronoff, D. M.; Oates, J. A.; Bouteau, O. New Insights into the Mechanism of Action of Acetaminophen: Its Clinical Pharmacologic Characteristics Reflect Its Inhibition of the Two Prostaglandin H2 Synthases. *Clin. Pharmacol. Ther.* **2006**, 79 (1), 9–19.
- 50 Chandrasekharan, N. V.; Dai, H.; Roos, K. L. T.; Evanson, N. K.; Tomsik, J.; Elton, T. S.; Simmons, D. L. COX-3, a Cyclooxygenase-1 Variant Inhibited by Acetaminophen and Other Analgesic/Antipyretic Drugs: Cloning, Structure, and Expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, 99 (21), 13926–13931.
- 51 Sprott, H.; Shen, H.; Gay, S.; Aeschlimann, A. Acetaminophen May Act through β Endorphin. *Ann. Rheum. Dis.* **2005**, 64 (10), 1522–1522.
- 52 Graham, G. G.; Scott, K. F.; Day, R. O. [Tolerability of paracetamol]. *Drugs* **2003**, 63 Spec No 2, 43–46.
- 53 Esterline, R. L.; Ray, S. D.; Ji, S. Reversible and Irreversible Inhibition of Hepatic Mitochondrial Respiration by Acetaminophen and Its Toxic Metabolite, N-Acetyl-p-Benzoquinoneimine (NAPQI). *Biochem. Pharmacol.* **1989**, 38 (14), 2387–2390.
- 54 Kaysen, G. A.; Pond, S. M.; Roper, M. H.; Menke, D. J.; Marrama, M. A. Combined Hepatic and Renal Injury in Alcoholics during Therapeutic Use of Acetaminophen. *Arch. Intern. Med.* **1985**, 145 (11), 2019–2023.
- 55 Mofredj, A.; Cadranel, J. F.; Darchy, B.; Barbare, J. C.; Cazier, A.; Pras, V.; Biour, M. [Hepatotoxicity caused by therapeutic doses of paracetamol in alcoholics. Report of 2 cases of fatal hepatitis in cirrhosis]. *Ann. Med. Interne (Paris)* **1999**, 150 (6), 507–511.
- 56 Moling, O.; Cairon, E.; Rimenti, G.; Rizza, F.; Pristerá, R.; Mian, P. Severe Hepatotoxicity after Therapeutic Doses of Acetaminophen. *Clin. Ther.* **2006**, 28 (5), 755–760.
- 57 Beaver, W. T. Review of the Analgesic Efficacy of Ibuprofen. *Int. J. Clin. Pract. Suppl.* **2003**, No. 135, 13–17.
- 58 Bergner, T.; Przybilla, B. Photosensitization Caused by Ibuprofen. *J. Am. Acad. Dermatol.* **1992**, 26 (1), 114–116.
- 59 Bushra, R.; Aslam, N. An Overview of Clinical Pharmacology of Ibuprofen. *Oman Med. J.* **2010**, 25 (3), 155–1661.
- 60 Ehrich, E. W.; Dallob, A.; De Lepeleire, I.; Van Hecken, A.; Riendeau, D.; Yuan, W.; Porras, A.; Wittreich, J.; Seibold, J. R.; De Schepper, P.; et al. Characterization of Rofecoxib as a Cyclooxygenase-2 Isoform Inhibitor and Demonstration of Analgesia in the Dental Pain Model. *Clin. Pharmacol. Ther.* **1999**, 65 (3), 336–347.

- 61 Moodley, I. Review of the Cardiovascular Safety of COXIBs Compared to NSAIDS. *Cardiovasc. J. Afr.* **2008**, *19* (2), 102–107.
- 62 Sun, S. X.; Lee, K. Y.; Bertram, C. T.; Goldstein, J. L. Withdrawal of COX-2 Selective Inhibitors Rofecoxib and Valdecoxib: Impact on NSAID and Gastroprotective Drug Prescribing and Utilization. *Curr. Med. Res. Opin.* **2007**, *23* (8), 1859–1866.
- 63 Dahan, A.; Aarts, L.; Smith, T. W. Incidence, Reversal, and Prevention of Opioid-Induced Respiratory Depression. *Anesthesiology* **2010**, *112* (1), 226–238.
- 64 Ramoutsaki, I. A.; Askitopoulou, H.; Konsolaki, E. Pain Relief and Sedation in Roman Byzantine Texts: Mandragoras Officinarum, Hyoscyamos Niger and Atropa Belladonna. *Int. Congr. Ser.* **2002**, *1242* (Supplement C), 43–50.
- 65 Vitez, T. S.; Macario, A. Setting Performance Standards for an Anesthesia Department. *J. Clin. Anesth.* **1998**, *10* (2), 166–175.
- 66 Bolser, D. C.; Davenport, P. W. Codeine and Cough: An Ineffective Gold Standard. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* **2007**, *7* (1), 32–36.
- 67 Inturrisi, C. E.; Schultz, M.; Shin, S.; Umans, J. G.; Angel, L.; Simon, E. J. Evidence from Opiate Binding Studies That Heroin Acts through Its Metabolites. *Life Sci.* **1983**, *33 Suppl 1*, 773–776
- 68 Lintzeris, N. Prescription of Heroin for the Management of Heroin Dependence: Current Status. *CNS Drugs* **2009**, *23* (6), 463–476.
- 69 Sawynok, J. The Therapeutic Use of Heroin: A Review of the Pharmacological Literature. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **1986**, *64* (1), 1–6.
- 70 Drewes, A. M.; Jensen, R. D.; Nielsen, L. M.; Droney, J.; Chrstrup, L. L.; Arendt-Nielsen, L.; Riley, J.; Dahan, A. Differences between Opioids: Pharmacological, Experimental, Clinical and Economical Perspectives. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **2013**, *75* (1), 60–78.
- 71 Power, I.; Brown, D. T.; Wildsmith, J. A. The Effect of Fentanyl, Meperidine and Diamorphine on Nerve Conduction in Vitro. *Reg. Anesth.* **1991**, *16* (4), 204–208.
- 72 Okie, S. A Flood of Opioids, a Rising Tide of Deaths. *N. Engl. J. Med.* **2010**, *363* (21), 1981–1985
- 73 Dhalla, I. A.; Persaud, N.; Juurlink, D. N. Facing up to the Prescription Opioid Crisis. *BMJ* **2011**, *343*, d5142.
- 74 Dart, R. C.; Surratt, H. L.; Cicero, T. J.; Parrino, M. W.; Severtson, S. G.; Bucher-Bartelson, B.; Green, J. L. Trends in Opioid Analgesic Abuse and Mortality in the United States. *N. Engl. J. Med.* **2015**, *372* (3), 241–248.

- 75 Maxwell, S.; Bigg, D.; Stanczykiewicz, K.; Carlberg-Racich, S. Prescribing Naloxone to Actively
Injecting Heroin Users: A Program to Reduce Heroin Overdose Deaths. *J. Addict. Dis.* **2006**, *25*
(3), 89–96.
- 76 Orman, J. S.; Keating, G. M. Buprenorphine/Naloxone: A Review of Its Use in the Treatment of
Opioid Dependence. *Drugs* **2009**, *69* (5), 577–607.
- 77 Latt, N. C.; Jurd, S.; Houseman, J.; Wutzke, S. E. Naltrexone in Alcohol Dependence: A
Randomised Controlled Trial of Effectiveness in a Standard Clinical Setting. *Med. J. Aust.* **2002**,
176 (11), 530–534
- 78 Dijkstra, B. A. G.; De Jong, C. A. J.; Bluschke, S. M.; Krabbe, P. F. M.; van der Staak, C. P. F.
Does Naltrexone Affect Craving in Abstinent Opioid-Dependent Patients? *Addict. Biol.* **2007**, *12*
(2), 176–182.
- 79 de Stoutz, N. D.; Bruera, E.; Suarez-Almazor, M. Opioid Rotation for Toxicity Reduction in
Terminal Cancer Patients. *J. Pain Symptom Manage.* **1995**, *10* (5), 378–384.
- 80 Jefferies, K. Treatment of Neuropathic Pain. *Semin. Neurol.* **2010**, *30* (04), 425–432.
- 81 Wolkerstorfer, A.; Handler, N.; Buschmann, H. New Approaches to Treating Pain. *Bioorg. Med.*
Chem. Lett. **2016**, *26* (4), 1103–1119
- 82 Westaway, S. M. The Potential of Transient Receptor Potential Vanilloid Type 1 Channel
Modulators for the Treatment of Pain. *J. Med. Chem.* **2007**, *50* (11), 2589–2596.
- 83 Mantyh, P. W.; Koltzenburg, M.; Mendell, L. M.; Tive, L.; Shelton, D. L. Antagonism of Nerve
Growth Factor-TrkA Signaling and the Relief of Pain. *Anesthesiology* **2011**, *115* (1), 189–204
- 84 Lane, N. E.; Schnitzer, T. J.; Birbara, C. A.; Mokhtarani, M.; Shelton, D. L.; Smith, M. D.; Brown,
M. T. Tanezumab for the Treatment of Pain from Osteoarthritis of the Knee. *N. Engl. J. Med.* **2010**,
363 (16), 1521–1531.
- 85 Krafte, D. S.; Bannon, A. W. Sodium Channels and Nociception: Recent Concepts and Therapeutic
Opportunities. *Curr. Opin. Pharmacol.* **2008**, *8* (1), 50–56.
- 86 Alloui, A.; Zimmermann, K.; Mamet, J.; Duprat, F.; Noël, J.; Chemin, J.; Guy, N.; Blondeau, N.;
Voilley, N.; Rubat-Coudert, C.; et al. TREK-1, a K⁺ Channel Involved in Polymodal Pain
Perception. *EMBO J.* **2006**, *25* (11), 2368–2376.
- 87 Field, M. J.; Li, Z.; Schwarz, J. B. Ca²⁺ Channel A2- δ Ligands for the Treatment of Neuropathic
Pain. *J. Med. Chem.* **2007**, *50* (11), 2569–2575.
- 88 Childers, W. E.; Baudy, R. B. N-Methyl-d-Aspartate Antagonists and Neuropathic Pain: The
Search for Relief. *J. Med. Chem.* **2007**, *50* (11), 2557–2562.

- 89 Schkeryantz, J. M.; Kingston, A. E.; Johnson, M. P. Prospects for Metabotropic Glutamate 1 Receptor Antagonists in the Treatment of Neuropathic Pain. *J. Med. Chem.* **2007**, *50* (11), 2563–2568.
- 90 Brederson, J.-D.; Kym, P. R.; Szallasi, A. Targeting TRP Channels for Pain Relief. *Eur. J. Pharmacol.* **2013**, *716* (1–3), 61–76.
- 91 de Lera Ruiz, M.; Kraus, R. L. Voltage-Gated Sodium Channels: Structure, Function, Pharmacology, and Clinical Indications. *J. Med. Chem.* **2015**, *58* (18), 7093–7118.
- 92 Wood, J. N.; Boorman, J. P.; Okuse, K.; Baker, M. D. Voltage-Gated Sodium Channels and Pain Pathways. *J. Neurobiol.* **2004**, *61* (1), 55–71.
- 93 Cummins, T. R.; Sheets, P. L.; Waxman, S. G. The Roles of Sodium Channels in Nociception: Implications for Mechanisms of Pain. *Pain* **2007**, *131* (3), 243–257.
- 94 Collins, S.; Sigtermans, M. J.; Dahan, A.; Zuurmond, W. W. A.; Perez, R. S. G. M. NMDA Receptor Antagonists for the Treatment of Neuropathic Pain. *Pain Med. Malden Mass* **2010**, *11* (11), 1726–1742.
- 95 Vela, J. M.; Merlos, M.; Almansa, C. Investigational Sigma-1 Receptor Antagonists for the Treatment of Pain. *Expert Opin. Investig. Drugs* **2015**, *24* (7), 883–896.
- 96 Zamanillo, D.; Romero, L.; Merlos, M.; Vela, J. M. Sigma 1 Receptor: A New Therapeutic Target for Pain. *Eur. J. Pharmacol.* **2013**, *716* (1–3), 78–93.
- 97 Donnier-Maréchal, M.; Carato, P.; Larchanché, P.-E.; Ravez, S.; Boulahjar, R.; Barczyk, A.; Oxombre, B.; Vermersch, P.; Melnyk, P. Synthesis and Pharmacological Evaluation of Benzamide Derivatives as Potent and Selective Sigma-1 Protein Ligands. *Eur. J. Med. Chem.* **2017**, *138* (Supplement C), 964–978.
- 98 Almansa, C.; Vela, J. M. Selective Sigma-1 Receptor Antagonists for the Treatment of Pain. *Future Med. Chem.* **2014**, *6* (10), 1179–1199.
- 99 Hosking, R. D.; Zajicek, J. P. Therapeutic Potential of Cannabis in Pain Medicine. *Br. J. Anaesth.* **2008**, *101* (1), 59–68.
- 100 Anand, P.; Whiteside, G.; Fowler, C. J.; Hohmann, A. G. Targeting CB2 Receptors and the Endocannabinoid System for the Treatment of Pain. *Brain Res. Rev.* **2009**, *60* (1), 255–266.
- 101 Guindon, J.; Hohmann, A. G. Cannabinoid CB2 Receptors: A Therapeutic Target for the Treatment of Inflammatory and Neuropathic Pain. *Br. J. Pharmacol.* **2008**, *153* (2), 319–334.
- 102 Lakhan, S. E.; Rowland, M. Whole Plant Cannabis Extracts in the Treatment of Spasticity in Multiple Sclerosis: A Systematic Review. *BMC Neurol.* **2009**, *9*, 59.

- 103 McCarberg, B. H. Cannabinoids. *J. Pain Palliat. Care Pharmacother.* **2007**, 21 (3), 19–28.
- 104 Goldstein, A.; Lowney, L. I.; Pal, B. K. Stereospecific and Nonspecific Interactions of the Morphine Congener Levorphanol in Subcellular Fractions of Mouse Brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1971**, 68 (8), 1742–1747.
- 105 Pert, C. B.; Snyder, S. H. Opiate Receptor: Demonstration in Nervous Tissue. *Science* **1973**, 179 (4077), 1011–1014.
- 106 Hughes, J.; Smith, T. W.; Kosterlitz, H. W.; Fothergill, L. A.; Morgan, B. A.; Morris, H. R. Identification of Two Related Pentapeptides from the Brain with Potent Opiate Agonist Activity. *Nature* **1975**, 258 (5536), 577–580.
- 107 Li, C. H.; Chung, D. Isolation and Structure of an Untriakontapeptide with Opiate Activity from Camel Pituitary Glands. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1976**, 73 (4), 1145–1148.
- 108 Stein, C.; Schäfer, M.; Machelska, H. Attacking Pain at Its Source: New Perspectives on Opioids. *Nat. Med.* **2003**, 9 (8), 1003–1008.
- 109 Corbett, A. D.; Henderson, G.; McKnight, A. T.; Paterson, S. J. 75 Years of Opioid Research: The Exciting but Vain Quest for the Holy Grail. *Br. J. Pharmacol.* **2006**, 147 Suppl 1, S153-162.
- 110 Zadina, J. E.; Hackler, L.; Ge, L. J.; Kastin, A. J. A Potent and Selective Endogenous Agonist for the Mu-Opiate Receptor. *Nature* **1997**, 386 (6624), 499–502.
- 111 Kieffer, B. L.; Befort, K.; Gaveriaux-Ruff, C.; Hirth, C. G. The Delta-Opioid Receptor: Isolation of a cDNA by Expression Cloning and Pharmacological Characterization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1992**, 89 (24), 12048–12052.
- 112 Land, B. B.; Bruchas, M. R.; Lemos, J. C.; Xu, M.; Melief, E. J.; Chavkin, C. The Dysphoric Component of Stress Is Encoded by Activation of the Dynorphin Kappa-Opioid System. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **2008**, 28 (2), 407–414.
- 113 Mollereau, C.; Parmentier, M.; Mailleux, P.; Butour, J. L.; Moisand, C.; Chalon, P.; Caput, D.; Vassart, G.; Meunier, J. C. ORL1, a Novel Member of the Opioid Receptor Family. Cloning, Functional Expression and Localization. *FEBS Lett.* **1994**, 341 (1), 33–38.
- 114 Henderson, G.; McKnight, A. T. The Orphan Opioid Receptor and Its Endogenous Ligand--Nociceptin/Orphanin FQ. *Trends Pharmacol. Sci.* **1997**, 18 (8), 293–300.
- 115 Fang, Y.; Kenakin, T.; Liu, C. Editorial: Orphan GPCRs As Emerging Drug Targets. *Front. Pharmacol.* **2015**, 6.

- 116 Rasmussen, S. G. F.; DeVree, B. T.; Zou, Y.; Kruse, A. C.; Chung, K. Y.; Kobilka, T. S.; Thian, F. S.; Chae, P. S.; Pardon, E.; Calinski, D.; et al. Crystal Structure of the B2 Adrenergic Receptor-Gs Protein Complex. *Nature* **2011**, 477 (7366), 549–555.
- 117 The Nobel Prize in Chemistry 2012 - Press Release https://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2012/press.html (accessed Oct 24, 2017).
- 118 Landry, Y.; Gies, G. P. Récepteurs Heptahélicoïdaux, Protéines G Trimériquez et Signalisation Par l'AMP Cyclique. In *Pharmacologie-Des cibles vers l'indication thérapeutique*; Sciences sup; Dunod: Paris, 2003; pp 183–207.
- 119 Bockaert, J.; Pin, J. P. Molecular Tinkering of G Protein-Coupled Receptors: An Evolutionary Success. *EMBO J.* **1999**, 18 (7), 1723–1729.
- 120 Attwood, T. K.; Croning, M. D. R.; Gaulton, A. Deriving Structural and Functional Insights from a Ligand-Based Hierarchical Classification of G Protein-Coupled Receptors. *Protein Eng. Des. Sel.* **2002**, 15 (1), 7–12.
- 121 Granier, S.; Manglik, A.; Kruse, A. C.; Kobilka, T. S.; Thian, F. S.; Weis, W. I.; Kobilka, B. K. Structure of the δ -Opioid Receptor Bound to Naltrindole. *Nature* **2012**, 485 (7398), 400–404.
- 122 Fenalti, G.; Giguere, P. M.; Katritch, V.; Huang, X.-P.; Thompson, A. A.; Cherezov, V.; Roth, B. L.; Stevens, R. C. Molecular Control of δ -Opioid Receptor Signaling. *Nature* **2014**, 506 (7487), 191–196.
- 123 Wu, H.; Wacker, D.; Mileni, M.; Katritch, V.; Han, G. W.; Vardy, E.; Liu, W.; Thompson, A. A.; Huang, X.-P.; Carroll, F. I.; et al. Structure of the Human κ -Opioid Receptor in Complex with JDTic. *Nature* **2012**, 485 (7398), 327–332.
- 124 Dror, R. O.; Pan, A. C.; Arlow, D. H.; Borhani, D. W.; Maragakis, P.; Shan, Y.; Xu, H.; Shaw, D. E. Pathway and Mechanism of Drug Binding to G-Protein-Coupled Receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2011**, 108 (32), 13118–13123.
- 125 Rosenbaum, D. M.; Zhang, C.; Lyons, J. A.; Holl, R.; Aragao, D.; Arlow, D. H.; Rasmussen, S. G. F.; Choi, H.-J.; DeVree, B. T.; Sunahara, R. K.; et al. Structure and Function of an Irreversible Agonist-B2 Adrenoceptor Complex. *Nature* **2011**, 469 (7329), 236–240.
- 126 Huang, W.; Manglik, A.; Venkatakrishnan, A. J.; Laeremans, T.; Feinberg, E. N.; Sanborn, A. L.; Kato, H. E.; Livingston, K. E.; Thorsen, T. S.; Kling, R. C.; et al. Structural Insights into M-Opioid Receptor Activation. *Nature* **2015**, 524 (7565), 315–321.

- 127 Portoghese, P. S.; Sultana, M.; Nagase, H.; Takemori, A. E. Application of the Message-Address Concept in the Design of Highly Potent and Selective Non-Peptide δ -Opioid Receptor Antagonists. *J. Med. Chem.* **1988**, *31* (2), 281–282.
- 128 Marie, N.; Landemore, G.; Debout, C.; Jauzac, P.; Allouche, S. Pharmacological Characterization of AR-M1000390 at Human δ -Opioid Receptors. *Life Sci.* **2003**, *73* (13), 1691–1704.
- 129 Fukuda, K.; Terasako, K.; Kato, S.; Mori, K. Identification of the Amino Acid Residues Involved in Selective Agonist Binding in the First Extracellular Loop of the δ - and μ -Opioid Receptors. *FEBS Lett.* **1995**, *373* (2), 177–181.
- 130 Ballesteros, J. A.; Weinstein, H. [19] Integrated Methods for the Construction of Three-Dimensional Models and Computational Probing of Structure-Function Relations in G Protein-Coupled Receptors. In *Methods in Neurosciences*; Sealfon, S. C., Ed.; Receptor Molecular Biology; Academic Press, 1995; Vol. 25, pp 366–428.
- 131 Strahs, D.; Weinstein, H. Comparative Modeling and Molecular Dynamics Studies of the δ , κ and μ Opioid Receptors. *Protein Eng. Des. Sel.* **1997**, *10* (9), 1019–1038.
- 132 Morley, J. S. Structure-Activity Relationships of Enkephalin-like Peptides. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **1980**, *20*, 81–110.
- 133 Fenalti, G.; Zatsepin, N. A.; Betti, C.; Giguere, P.; Han, G. W.; Ishchenko, A.; Liu, W.; Guillemyn, K.; Zhang, H.; James, D.; et al. Structural Basis for Bifunctional Peptide Recognition at Human δ -Opioid Receptor. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2015**, *22* (3), nsmb.2965.
- 134 Manglik, A.; Kruse, A. C. Structural Basis for G Protein-Coupled Receptor Activation. *Biochemistry (Mosc.)* **2017**, *56* (42), 5628–5634.
- 135 Liang, Y.-L.; Khoshouei, M.; Radjainia, M.; Zhang, Y.; Glukhova, A.; Tarrasch, J.; Thal, D. M.; Furness, S. G. B.; Christopoulos, G.; Coudrat, T.; et al. Phase-Plate Cryo-EM Structure of a Class B GPCR–G-Protein Complex. *Nature* **2017**, *546* (7656), 118–123.
- 136 Manglik, A.; Kobilka, B. K.; Steyaert, J. Nanobodies to Study G Protein–Coupled Receptor Structure and Function. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2017**, *57* (1), 19–37.
- 137 Kang, Y.; Zhou, X. E.; Gao, X.; He, Y.; Liu, W.; Ishchenko, A.; Barty, A.; White, T. A.; Yefanov, O.; Han, G. W.; et al. Crystal Structure of Rhodopsin Bound to Arrestin by Femtosecond X-Ray Laser. *Nature* **2015**, *523* (7562), 561–567.
- 138 Scheerer, P.; Park, J. H.; Hildebrand, P. W.; Kim, Y. J.; Krauß, N.; Choe, H.-W.; Hofmann, K. P.; Ernst, O. P. Crystal Structure of Opsin in Its G-Protein-Interacting Conformation. *Nature* **2008**, *455* (7212), 497–502.

- ¹³⁹ Huang, W.; Manglik, A.; Venkatakrishnan, A. J.; Laeremans, T.; Feinberg, E. N.; Sanborn, A. L.; Kato, H. E.; Livingston, K. E.; Thorsen, T. S.; Kling, R. C.; et al. Structural Insights into M-Opioid Receptor Activation. *Nature* **2015**, *524* (7565), 315–321.
- ¹⁴⁰ Zhang, Y.; Sun, B.; Feng, D.; Hu, H.; Chu, M.; Qu, Q.; Tarrasch, J. T.; Li, S.; Sun Kobilka, T.; Kobilka, B. K.; et al. Cryo-EM Structure of the Activated GLP-1 Receptor in Complex with a G Protein. *Nature* **2017**, *546* (7657), 248–253.
- ¹⁴¹ Jazayeri, A.; Rappas, M.; Brown, A. J. H.; Kean, J.; Errey, J. C.; Robertson, N. J.; Fiez-Vandal, C.; Andrews, S. P.; Congreve, M.; Bortolato, A.; et al. Crystal Structure of the GLP-1 Receptor Bound to a Peptide Agonist. *Nature* **2017**, *546* (7657), 254–258.
- ¹⁴² Preininger, A. M.; Meiler, J.; Hamm, H. E. Conformational Flexibility and Structural Dynamics in GPCR-Mediated G Protein Activation: A Perspective. *J. Mol. Biol.* **2013**, *425* (13), 2288–2298.
- ¹⁴³ Krumm, B. E.; White, J. F.; Shah, P.; Grisshammer, R. Structural Prerequisites for G-Protein Activation by the Neurotensin Receptor. *Nat. Commun.* **2015**, *6*, ncomms8895.
- ¹⁴⁴ Katritch, V.; Fenalti, G.; Abola, E. E.; Roth, B. L.; Cherezov, V.; Stevens, R. C. Allosteric Sodium in Class A GPCR Signaling. *Trends Biochem. Sci.* **2014**, *39* (5), 233–244.
- ¹⁴⁵ Snyder, S. H.; Pasternak, G. W. Historical Review: Opioid Receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* **2003**, *24* (4), 198–205.
- ¹⁴⁶ Che, T.; Majumdar, S.; Zaidi, S. A.; Ondachi, P.; McCorvy, J. D.; Wang, S.; Mosier, P. D.; Uprety, R.; Vardy, E.; Krumm, B. E.; et al. Structure of the Nanobody-Stabilized Active State of the Kappa Opioid Receptor. *Cell* **2018**, *172* (1), 55–67.e15.
- ¹⁴⁷ Nagi, K.; Piñeyro, G. Regulation of Opioid Receptor Signalling: Implications for the Development of Analgesic Tolerance. *Mol. Brain* **2011**, *4*, 25.
- ¹⁴⁸ Bohn, L. M.; Gainetdinov, R. R.; Lin, F. T.; Lefkowitz, R. J.; Caron, M. G. Mu-Opioid Receptor Desensitization by Beta-Arrestin-2 Determines Morphine Tolerance but Not Dependence. *Nature* **2000**, *408* (6813), 720–723.
- ¹⁴⁹ Mansour, A.; Fox, C. A.; Akil, H.; Watson, S. J. Opioid-Receptor mRNA Expression in the Rat CNS: Anatomical and Functional Implications. *Trends Neurosci.* **1995**, *18* (1), 22–29.
- ¹⁵⁰ Benyamin, R.; Trescot, A. M.; Datta, S.; Buenaventura, R.; Adlaka, R.; Sehgal, N.; Glaser, S. E.; Vallejo, R. Opioid Complications and Side Effects. *Pain Physician* **2008**, *11* (2 Suppl), S105-120.
- ¹⁵¹ Regnard, C.; Twycross, R.; Mihalyo, M.; Wilcock, A. Loperamide. *J. Pain Symptom Manage.* **2011**, *42* (2), 319–323.

- 152 Schiller, L. R.; Ana, C. A. S.; Morawski, S. G.; Fordtran, J. S. Mechanism of the Antidiarrheal Effect of Loperamide. *Gastroenterology* **1984**, 86 (6), 1475–1480.
- 153 Vincent, J.-L.; Shehabi, Y.; Walsh, T. S.; Pandharipande, P. P.; Ball, J. A.; Spronk, P.; Longrois, D.; Strøm, T.; Conti, G.; Funk, G.-C.; et al. Comfort and Patient-Centred Care without Excessive Sedation: The ECASH Concept. *Intensive Care Med.* **2016**, 42, 962–971.
- 154 Shapiro, A.; Zohar, E.; Zaslansky, R.; Hoppenstein, D.; Shabat, S.; Fredman, B. The Frequency and Timing of Respiratory Depression in 1524 Postoperative Patients Treated with Systemic or Neuraxial Morphine. *J. Clin. Anesth.* **2005**, 17 (7), 537–542.
- 155 White, J. M.; Irvine, R. J. Mechanisms of Fatal Opioid Overdose. *Addiction* **1999**, 94 (7), 961–972.
- 156 Weschules, D. J. Development of Guidelines for Palliative Care Pharmacotherapy. *J. Pain Palliat. Care Pharmacother.* **2005**, 19 (4), 25–38.
- 157 Chaney, M. A. Side Effects of Intrathecal and Epidural Opioids. *Can. J. Anaesth. J. Can. Anesth.* **1995**, 42 (10), 891–903.
- 158 Hasebe, K.; Kawai, K.; Suzuki, T.; Kawamura, K.; Tanaka, T.; Narita, M.; Nagase, H.; Suzuki, T. Possible Pharmacotherapy of the Opioid Kappa Receptor Agonist for Drug Dependence. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2004**, 1025, 404–413.
- 159 Beardsley, P. M.; Howard, J. L.; Shelton, K. L.; Carroll, F. I. Differential Effects of the Novel Kappa Opioid Receptor Antagonist, JD(Tic), on Reinstatement of Cocaine-Seeking Induced by Footshock Stressors vs Cocaine Primes and Its Antidepressant-like Effects in Rats. *Psychopharmacology (Berl.)* **2005**, 183 (1), 118–126.
- 160 D’Addario, C.; Di Benedetto, M.; Izenwasser, S.; Candeletti, S.; Romualdi, P. Role of Serotonin in the Regulation of the Dynorphinergic System by a Kappa-Opioid Agonist and Cocaine Treatment in Rat CNS. *Neuroscience* **2007**, 144 (1), 157–164.
- 161 Gallantine, E. L.; Meert, T. F. A Comparison of the Antinociceptive and Adverse Effects of the Mu-Opioid Agonist Morphine and the Delta-Opioid Agonist SNC80. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* **2005**, 97 (1), 39–51.
- 162 Jutkiewicz, E. M.; Baladi, M. G.; Folk, J. E.; Rice, K. C.; Woods, J. H. The Convulsive and Electroencephalographic Changes Produced by Nonpeptidic Delta-Opioid Agonists in Rats: Comparison with Pentylentetrazol. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2006**, 317 (3), 1337–1348.
- 163 Broom, D. C.; Jutkiewicz, E. M.; Rice, K. C.; Traynor, J. R.; Woods, J. H. Behavioral Effects of Delta-Opioid Receptor Agonists: Potential Antidepressants? *Jpn. J. Pharmacol.* **2002**, 90 (1), 1–6.

- 164 Torregrossa, M. M.; Jutkiewicz, E. M.; Mosberg, H. I.; Balboni, G.; Watson, S. J.; Woods, J. H. Peptidic Delta Opioid Receptor Agonists Produce Antidepressant-like Effects in the Forced Swim Test and Regulate BDNF mRNA Expression in Rats. *Brain Res.* **2006**, *1069* (1), 172–181.
- 165 Zhang, J.; Qian, H.; Zhao, P.; Hong, S.-S.; Xia, Y. Rapid Hypoxia Preconditioning Protects Cortical Neurons from Glutamate Toxicity through Delta-Opioid Receptor. *Stroke* **2006**, *37* (4), 1094–1099.
- 166 See Hoe, L.; Patel, H. H.; Peart, J. N. Delta Opioid Receptors and Cardioprotection; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg; pp 1–34.
- 167 Henry, M. S.; Gendron, L.; Tremblay, M.-E.; Drolet, G. Enkephalins: Endogenous Analgesics with an Emerging Role in Stress Resilience <https://www.hindawi.com/journals/np/2017/1546125/abs/> (accessed Oct 25, 2017).
- 168 Reyes, B. A. S.; Kravets, J. L.; Connelly, K. L.; Unterwald, E. M.; Bockstaele, E. J. V. Localization of the Delta Opioid Receptor and Corticotropin-Releasing Factor in the Amygdalar Complex: Role in Anxiety. *Brain Struct. Funct.* **2017**, *222* (2), 1007–1026.
- 169 Beaudry, H.; Proteau-Gagné, A.; Li, S.; Dory, Y.; Chavkin, C.; Gendron, L. Differential Noxious and Motor Tolerance of Chronic Delta Opioid Receptor Agonists in Rodents. *Neuroscience* **2009**, *161* (2), 381–391.
- 170 Mika, J.; Przewłocki, R.; Przewłocka, B. The Role of δ -Opioid Receptor Subtypes in Neuropathic Pain. *Eur. J. Pharmacol.* **2001**, *415* (1), 31–37.
- 171 Petrillo, P.; Angelici, O.; Bingham, S.; Ficalora, G.; Garnier, M.; Zaratini, P. F.; Petrone, G.; Pozzi, O.; Sbacchi, M.; Stean, T. O.; et al. Evidence for a Selective Role of the δ -Opioid Agonist [8R-(4bS*,8a α ,8a β ,12b β)]7,10-Dimethyl-1-Methoxy-11-(2-Methylpropyl)Oxycarbonyl 5,6,7,8,12,12b-Hexahydro-(9H)-4,8-Methanobenzofuro[3,2-e]Pyrrolo[2,3-g]Isoquinoline Hydrochloride (SB-235863) in Blocking Hyperalgesia Associated with Inflammatory and Neuropathic Pain Responses. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2003**, *307* (3), 1079–1089.
- 172 Abdallah, K.; Gendron, L. The Delta Opioid Receptor in Pain Control. *Handb. Exp. Pharmacol.* **2017**.
- 173 Vanderah, T. W. Delta and Kappa Opioid Receptors as Suitable Drug Targets for Pain. *Clin. J. Pain* **2010**, *26*.
- 174 Pradhan, A. A.; Befort, K.; Nozaki, C.; Gavériaux-Ruff, C.; Kieffer, B. L. The Delta Opioid Receptor: An Evolving Target for the Treatment of Brain Disorders. *Trends Pharmacol. Sci.* **2011**, *32* (10), 581–590.

- 175 Negus, S. S.; Picker, M. J. BW373U86: A Non-Peptidic, Systemically-Active δ Opioid Agonist. *CNS Drug Rev.* **1996**, 2 (1), 52–74.
- 176 Calderon, S. N.; Rothman, R. B.; Porreca, F.; Flippen-Anderson, J. L.; McNutt, R. W.; Xu, H.; Smith, L. E.; Bilsky, E. J.; Davis, P.; Rice, K. C. Probes for Narcotic Receptor Mediated Phenomena. 19. Synthesis of (+)-4-[(AR)- α -((2S,5R)-4-Allyl-2,5-Dimethyl-1-Piperazinyl)-3-Methoxybenzyl]-N,N-Diethylbenzamide (SNC 80): A Highly Selective, Nonpeptide δ Opioid Receptor Agonist. *J. Med. Chem.* **1994**, 37 (14), 2125–2128.
- 177 Hong, E. J.; Rice, K. C.; Calderon, S.; Woods, J. H.; Traynor, J. R. Convulsive Behavior of Nonpeptide δ -Opioid Ligands: Comparison of SNC80 and BW373U86 in Mice. *Analgesia* **1998**, 3 (4), 269–276.
- 178 Dripps, I. J.; Wang, Q.; Neubig, R. R.; Rice, K. C.; Traynor, J. R.; Jutkiewicz, E. M. The Role of Regulator of G Protein Signaling 4 in Delta-Opioid Receptor-Mediated Behaviors. *Psychopharmacology (Berl.)* **2017**, 234 (1), 29–39.
- 179 Bourdonnec, B. L.; Windh, R. T.; Ajello, C. W.; Leister, L. K.; Gu, M.; Chu, G.-H.; Tuthill, P. A.; Barker, W. M.; Koblish, M.; Wiant, D. D.; et al. Potent, Orally Bioavailable Delta Opioid Receptor Agonists for the Treatment of Pain: Discovery of N,N-Diethyl-4-(5-Hydroxyspiro[Chromene-2,4'-Piperidine]-4-Yl)Benzamide (ADL5859). *J. Med. Chem.* **2008**, 51 (19), 5893–5896.
- 180 Le Bourdonnec, B.; Windh, R. T.; Leister, L. K.; Zhou, Q. J.; Ajello, C. W.; Gu, M.; Chu, G.-H.; Tuthill, P. A.; Barker, W. M.; Koblish, M.; et al. Spirocyclic Delta Opioid Receptor Agonists for the Treatment of Pain: Discovery of N,N-Diethyl-3-Hydroxy-4-(Spiro[Chromene-2,4'-Piperidine]-4-Yl) Benzamide (ADL5747). *J. Med. Chem.* **2009**, 52 (18), 5685–5702.
- 181 Spahn, V.; Stein, C. Targeting Delta Opioid Receptors for Pain Treatment: Drugs in Phase I and II Clinical Development. *Expert Opin. Investig. Drugs* **2017**, 26 (2), 155–160.
- 182 Gengo, P. J.; Pettit, H. O.; O'Neill, S. J.; Wei, K.; McNutt, R.; Bishop, M. J.; Chang, K.-J. DPI-3290 [(+)-3-((α -R)- α -((2S,5R)-4-Allyl-2,5-Dimethyl-1-Piperazinyl)-3-Hydroxybenzyl)-N-(3-Fluorophenyl)-N-Methylbenzamide]. I. A Mixed Opioid Agonist with Potent Antinociceptive Activity. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2003**, 307 (3), 1221–1226.
- 183 Gengo, P. J.; Pettit, H. O.; O'Neill, S. J.; Su, Y. F.; McNutt, R.; Chang, K.-J. DPI-3290 [(+)-3-((α -R)- α -((2S,5R)-4-Allyl-2,5-Dimethyl-1-Piperazinyl)-3-Hydroxybenzyl)-N-(3-Fluorophenyl)-N-Methylbenzamide]. II. A Mixed Opioid Agonist with Potent Antinociceptive Activity and Limited Effects on Respiratory Function. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2003**, 307 (3), 1227–1233.

- 184 Ananthan, S. Opioid Ligands with Mixed Mu/Delta Opioid Receptor Interactions: An Emerging Approach to Novel Analgesics. *AAPS J.* 2006, 8 (1), E118-125.
- 185 Gomes, I.; Jordan, B. A.; Gupta, A.; Trapaidze, N.; Nagy, V.; Devi, L. A. Heterodimerization of μ and δ Opioid Receptors: A Role in Opiate Synergy. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **2000**, 20 (22), RC110.
- 186 Portoghese, P. S.; Akgün, E.; Lunzer, M. M. Heteromer Induction: An Approach to Unique Pharmacology? *ACS Chem. Neurosci.* **2017**, 8 (3), 426–428.
- 187 Daniels, D. J.; Lenard, N. R.; Etienne, C. L.; Law, P.-Y.; Roerig, S. C.; Portoghese, P. S. Opioid-Induced Tolerance and Dependence in Mice Is Modulated by the Distance between Pharmacophores in a Bivalent Ligand Series. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2005**, 102 (52), 19208–19213.
- 188 Aceto, M. D.; Harris, L. S.; Negus, S. S.; Banks, M. L.; Hughes, L. D.; Akgün, E.; Portoghese, P. S. MDAN-21: A Bivalent Opioid Ligand Containing Mu-Agonist and Delta-Antagonist Pharmacophores and Its Effects in Rhesus Monkeys. *Int. J. Med. Chem.* **2012**, 2012, 327257
- 189 Günther, T.; Dasgupta, P.; Mann, A.; Miess, E.; Kliewer, A.; Fritzwanker, S.; Steinborn, R.; Schulz, S. Targeting Multiple Opioid Receptors – Improved Analgesics with Reduced Side Effects? *Br. J. Pharmacol.* n/a-n/a.
- 190 Schiller, P. W.; Fundytus, M. E.; Merovitz, L.; Weltrowska, G.; Nguyen, T. M.-D.; Lemieux, C.; Chung, N. N.; Coderre, T. J. The Opioid μ Agonist/ δ Antagonist DIPP-NH₂[Ψ] Produces a Potent Analgesic Effect, No Physical Dependence, and Less Tolerance than Morphine in Rats. *J. Med. Chem.* **1999**, 42 (18), 3520–3526.
- 191 Balboni, G.; Guerrini, R.; Salvadori, S.; Bianchi, C.; Rizzi, D.; Bryant, S. D.; Lazarus, L. H. Evaluation of the Dmt–Tic Pharmacophore: Conversion of a Potent δ -Opioid Receptor Antagonist into a Potent δ Agonist and Ligands with Mixed Properties. *J. Med. Chem.* **2002**, 45 (3), 713–720.
- 192 Balboni, G.; Salvadori, S.; Trapella, C.; Knapp, B. I.; Bidlack, J. M.; Lazarus, L. H.; Peng, X.; Neumeyer, J. L. Evolution of the Bifunctional Lead μ Agonist/ δ Antagonist Containing the 2',6'-Dimethyl-1-Tyrosine–1,2,3,4-Tetrahydroisoquinoline-3-Carboxylic Acid (Dmt–Tic) Opioid Pharmacophore. *ACS Chem. Neurosci.* **2009**, 1 (2), 155–164.
- 193 Balboni, G.; Onnis, V.; Congiu, C.; Zotti, M.; Sasaki, Y.; Ambo, A.; Bryant, S. D.; Jinsmaa, Y.; Lazarus, L. H.; Trapella, C.; et al. Effect of Lysine at C-Terminus of the Dmt-Tic Opioid Pharmacophore. *J. Med. Chem.* **2006**, 49 (18), 5610–5617.

- 194 Starnowska, J.; Costante, R.; Guillemyn, K.; Popiolek-Barczyk, K.; Chung, N. N.; Lemieux, C.; Keresztes, A.; Van Duppen, J.; Mollica, A.; Streicher, J.; et al. Analgesic Properties of Opioid/NK1 Multitarget Ligands with Distinct in Vitro Profiles in Naive and Chronic Constriction Injury Mice. *ACS Chem. Neurosci.* **2017**, 8 (10), 2315–2324.
- 195 Mansour, A.; Hoversten, M. T.; Taylor, L. P.; Watson, S. J.; Akil, H. The Cloned μ , δ and κ Receptors and Their Endogenous Ligands: Evidence for Two Opioid Peptide Recognition Cores. *Brain Res.* **1995**, 700 (1), 89–98.
- 196 Erspamer, V.; Melchiorri, P.; Falconieri-Erspamer, G.; Negri, L.; Corsi, R.; Severini, C.; Barra, D.; Simmaco, M.; Kreil, G. Deltorphins: A Family of Naturally Occurring Peptides with High Affinity and Selectivity for Delta Opioid Binding Sites. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1989**, 86 (13), 5188–5192.
- 197 Fiori, A.; Cardelli, P.; Negri, L.; Savi, M. R.; Strom, R.; Erspamer, V. Deltorphin Transport across the Blood–brain Barrier. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1997**, 94 (17), 9469–9474.
- 198 Marastoni, M.; Tomatis, R.; Balboni, G.; Salvadori, S.; Lazarus, L. H. On the Degradation of the Deltorphin Peptides by Plasma and Brain Homogenate. *Farm. Soc. Chim. Ital.* 1989 **1991**, 46 (11), 1273–1279.
- 199 Balboni, G.; Marastoni, M.; Picone, D.; Salvadori, S.; Tancredi, T.; Temussi, P. A.; Tomatis, R. New Features of the δ Opioid Receptor: Conformational Properties of Deltorphin I Analogues. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1990**, 169 (2), 617–622.
- 200 Lazarus, L. H.; Salvadori, S.; Attila, M.; Grieco, P.; Bundy, D. M.; Wilson, W. E.; Tomatis, R. Interaction of Deltorphin with Opioid Receptors: Molecular Determinants for Affinity and Selectivity. *Peptides* **1993**, 14 (1), 21–28.
- 201 Li, A. P. Accurate Prediction of Human Drug Toxicity: A Major Challenge in Drug Development. *Chem. Biol. Interact.* **2004**, 150 (1), 3–7.
- 202 Cornford, E. M.; Braun, L. D.; Crane, P. D.; Oldendorf, W. H. Blood-Brain Barrier Restriction of Peptides and the Low Uptake of Enkephalins. *Endocrinology* **1978**, 103 (4), 1297–1303.
- 203 Pardridge, W. M. The Blood-Brain Barrier: Bottleneck in Brain Drug Development. *NeuroRX* **2005**, 2 (1), 3–14.
- 204 Hitchcock, S. A.; Pennington, L. D. Structure–Brain Exposure Relationships. *J. Med. Chem.* **2006**, 49 (26), 7559–7583.
- 205 Pardridge, W. M.; Mietus, L. J. Enkephalin and Blood-Brain Barrier: Studies of Binding and Degradation in Isolated Brain Micro Vessels. *Endocrinology* **1981**, 109 (4), 1138–1143.

- 206 Ganapathy, V.; Miyauchi, S. Transport Systems for Opioid Peptides in Mammalian Tissues. *AAPS J.* **2005**, 7 (4), E852–E856
- 207 Lyons, P. J.; Callaway, M. B.; Fricker, L. D. Characterization of Carboxypeptidase A6, an Extracellular Matrix Peptidase. *J. Biol. Chem.* **2008**, 283 (11), 7054–7063.
- 208 Roques, B. P.; Noble, F.; Daugé, V.; Fournié-Zaluski, M. C.; Beaumont, A. Neutral Endopeptidase 24.11: Structure, Inhibition, and Experimental and Clinical Pharmacology. *Pharmacol. Rev.* **1993**, 45 (1), 87–146.
- 209 Benuck, M.; Berg, M. J.; Marks, N. Separate Metabolic Pathways for Leu-Enkephalin and Met-Enkephalin-Arg6-Phe7 Degradation by Rat Striatal Synaptosomal Membranes. *Neurochem. Int.* **1982**, 4 (5), 389–396.
- 210 Thanawala, V.; Kadam, V. J.; Ghosh, R. Enkephalinase Inhibitors: Potential Agents for the Management of Pain. *Curr. Drug Targets* **2008**, 9 (10), 887–894.
- 211 Beddell, C. R.; Clark, R. B.; Hardy, G. W.; Lowe, L. A.; Ubatuba, F. B.; Vane, J. R.; Wilkinson, S. Structural Requirements for Opioid Activity of Analogues of the Enkephalins. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **1977**, 198 (1132), 249–265.
- 212 Ripka, A. S.; Rich, D. H. Peptidomimetic Design. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1998**, 2 (4), 441–452
- 213 Qvit, N.; Rubin, S. J. S.; Urban, T. J.; Mochly-Rosen, D.; Gross, E. R. Peptidomimetic Therapeutics: Scientific Approaches and Opportunities. *Drug Discov. Today* **2017**, 22 (2), 454–462.
- 214 O'Connor, S. J.; Barr, K. J.; Wang, L.; Sorensen, B. K.; Tasker, A. S.; Sham, H.; Ng, S. C.; Cohen, J.; Devine, E.; Cherian, S.; et al. Second-Generation Peptidomimetic Inhibitors of Protein Farnesyltransferase Demonstrating Improved Cellular Potency and Significant in Vivo Efficacy. *J. Med. Chem.* **1999**, 42 (18), 3701–3710.
- 215 Nestor Jr., J. J. The Medicinal Chemistry of Peptides. *Curr. Med. Chem.* **2009**, 16 (33), 4399–4418.
- 216 Rochon, K.; Proteau-Gagné, A.; Bourassa, P.; Nadon, J.-F.; Côté, J.; Bournival, V.; Gobeil, F.; Guérin, B.; Dory, Y. L.; Gendron, L. Preparation and Evaluation at the Delta Opioid Receptor of a Series of Linear Leu-Enkephalin Analogues Obtained by Systematic Replacement of the Amides. *ACS Chem. Neurosci.* **2013**, 4 (8), 1204–1216.
- 217 Nabuurs, S. B.; Wagener, M.; de Vlieg, J. A Flexible Approach to Induced Fit Docking. *J. Med. Chem.* **2007**, 50 (26), 6507–6518.
- 218 Kessler, H. Peptoids—A New Approach to the Development of Pharmaceuticals. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1993**, 32 (4), 543–544.

- 219 Leslie, F. M.; Chavkin, C.; Cox, B. M. Opioid Binding Properties of Brain and Peripheral Tissues: Evidence for Heterogeneity in Opioid Ligand Binding Sites. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1980**, 214 (2), 395–402.
- 220 Janecka, A.; Fichna, J.; Janecki, T. Opioid Receptors and Their Ligands. *Curr. Top. Med. Chem.* **2004**, 4 (1), 1–17.
- 221 Schulz, R.; Wüster, M.; Krenss, H.; Herz, A. Selective Development of Tolerance without Dependence in Multiple Opiate Receptors of Mouse Vas Deferens. *Nature* **1980**, 285 (5762), 242–243.
- 222 Moulin, D. E.; Max, M. B.; Kaiko, R. F.; Inturrisi, C. E.; Maggard, J.; Yaksh, T. L.; Foley, K. M. The Analgesic Efficacy of Intrathecal D-Ala2-d-Leu5-Enkephalin in Cancer Patients with Chronic Pain. *Pain* **1985**, 23 (3), 213–221.
- 223 Gacel, G.; Fournie-Zaluski, M.-C.; Roques, B. P. D-Tyr—Ser—Gly—Phe—Leu—Thr, a Highly Preferential Ligand for δ -Opiate Receptors. *FEBS Lett.* **1980**, 118 (2), 245–247.
- 224 Zajac, J.-M.; Gacel, G.; Petit, F.; Dodey, P.; Rossignol, P.; Roques, B. P. Deltakephalin, Tyr-D-Thr-Gly-Phe-Leu-Thr: A New Highly Potent and Fully Specific Agonist for Opiate δ -Receptors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1983**, 111 (2), 390–397.
- 225 Gacel, G. A.; Fellion, E.; Baamonde, A.; Dauge, V.; Roques, B. P. Synthesis, Biochemical and Pharmacological Properties of BUBUC, a Highly Selective and Systemically Active Agonist for in Vivo Studies of δ -Opioid Receptors. *Peptides* **1990**, 11 (5), 983–988.
- 226 Berezowska, I.; Chung, N. N.; Lemieux, C.; Wilkes, B. C.; Schiller, P. W. Agonist vs Antagonist Behavior of δ Opioid Peptides Containing Novel Phenylalanine Analogues in Place of Tyr1. *J. Med. Chem.* **2009**, 52 (21), 6941–6945.
- 227 Berezowska, I.; Lemieux, C.; Chung, N. N.; Ding, J.; Schiller, P. W. Novel TIPP (H-Tyr-Tic-Phe-Phe-OH) Analogues Displaying a Wide Range of Efficacies at the δ Opioid Receptor. Discovery of Two Highly Potent and Selective δ Opioid Agonists. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, 22 (5), 1899–1902.
- 228 Hruby, V. J.; Agnes, R. S. Conformation-Activity Relationships of Opioid Peptides with Selective Activities at Opioid Receptors. *Biopolymers* **1999**, 51 (6), 391–410.
- 229 De Marco, R.; Bedini, A.; Spampinato, S.; Cavina, L.; Pirazzoli, E.; Gentilucci, L. Versatile Picklocks To Access All Opioid Receptors: Tuning the Selectivity and Functional Profile of the Cyclotetrapeptide c[Phe-d-Pro-Phe-Trp] (CJ-15,208). *J. Med. Chem.* **2016**, 59 (19), 9255–9261.

- 230 Maeda, M.; Kawasaki, K.; Watanabe, J.; Kaneto, H. Amino Acids and Peptides. X.: Leu-Enkephalin Analogues Containing a Fluorinated Aromatic Amino Acid. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **1989**, 37 (3), 826–828.
- 231 Marsault, E.; Peterson, M. L. Macrocycles Are Great Cycles: Applications, Opportunities, and Challenges of Synthetic Macrocycles in Drug Discovery. *J. Med. Chem.* **2011**, 54 (7), 1961–2004.
- 232 Mosberg, H. I.; Hurst, R.; Hruby, V. J.; Gee, K.; Yamamura, H. I.; Galligan, J. J.; Burks, T. F. Bis-Penicillamine Enkephalins Possess Highly Improved Specificity toward Delta Opioid Receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1983**, 80 (19), 5871–5874.
- 233 Svensson, C. I.; Rew, Y.; Malkmus, S.; Schiller, P. W.; Taulane, J. P.; Goodman, M.; Yaksh, T. L. Systemic and Spinal Analgesic Activity of a Delta-Opioid-Selective Lanthionine Enkephalin Analog. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2003**, 304 (2), 827–832.
- 234 Mosberg, H. I.; Omnaas, J. R.; Medzihradsky, F.; Smith, C. B. Cyclic, Disulfide- and Dithioether-Containing Opioid Tetrapeptides: Development of a Ligand with High Delta Opioid Receptor Selectivity and Affinity. *Life Sci.* **1988**, 43 (12), 1013–1020.
- 235 Mosberg, H. I.; Lomize, A. L.; Wang, C.; Kroona, H.; Heyl, D. L.; Sobczyk-Kojiro, K.; Ma, W.; Mousigian, C.; Porreca, F. Development of a Model for the Delta Opioid Receptor Pharmacophore. 1. Conformationally Restricted Tyr1 Replacements in the Cyclic Delta Receptor Selective Tetrapeptide Tyr-c[D-Cys-Phe-D-Pen]OH (JOM-13). *J. Med. Chem.* **1994**, 37 (25), 4371–4383.
- 236 Mosberg, H. I.; Fowler, C. B. Development and Validation of Opioid Ligand–receptor Interaction Models: The Structural Basis of Mu vs. Delta Selectivity. *J. Pept. Res.* **2002**, 60 (6), 329–335.
- 237 Mosberg, H. I. Model-Peptide Synthesis and Molecular Recognition Lab <http://mosberglab.phar.umich.edu/resources/>.
- 238 Structures cristallographique de la Leu-Enképhalines disponibles sur la base de données ccdc.cam.ac.uk <https://www.ccdc.cam.ac.uk/structures/Search?Compound=enkephalin>.
- 239 Hudson, D.; Sharpe, R.; Szelke, M. Methionine Enkephalin and Isosteric Analogues. *Int. J. Pept. Protein Res.* **1980**, 15 (2), 122–129.
- 240 Malicka, J.; Czaplewski, C.; Groth, M.; Wicz, W.; Oldziej, S.; Lankiewicz, L.; Ciarkowski, J.; Liwo, A. Use of NMR and Fluorescence Spectroscopy as Well as Theoretical Conformational Analysis in Conformation-Activity Studies of Cyclic Enkephalin Analogues. *Curr. Top. Med. Chem.* **2004**, 4 (1), 123–133.

- 241 Abdali, S.; Jensen, M. Ø.; Bohr, H. Energy Levels and Quantum States of [Leu]Enkephalin Conformations Based on Theoretical and Experimental Investigations. *J. Phys. Condens. Matter* **2003**, *15* (18), S1853.
- 242 Proteau-Gagné, A. Conception et synthèse d'analogues de Leu enképhalines ciblant le récepteur opioïdergique delta. **2014**.
- 243 Nadon, J.-F. Leu-enképhaline et peptidomimétisme : Une ouverture vers la synthèse d'analogues au profil pharmacocinétique amélioré. **2014**.
- 244 Proteau-Gagné, A.; Bournival, V.; Rochon, K.; Dory, Y. L.; Gendron, L. Exploring the Backbone of Enkephalins To Adjust Their Pharmacological Profile for the δ -Opioid Receptor. *ACS Chem. Neurosci.* **2010**, *1* (11), 757–769
- 245 Proteau-Gagné, A.; Rochon, K.; Roy, M.; Albert, P.-J.; Guérin, B.; Gendron, L.; Dory, Y. L. Systematic Replacement of Amides by 1,4-Disubstituted[1,2,3]Triazoles in Leu-Enkephalin and the Impact on the Delta Opioid Receptor Activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, *23* (19), 5267–5269.
- 246 Nadon, J.-F.; Rochon, K.; Grastilleur, S.; Langlois, G.; Dao, T. T. H.; Blais, V.; Guérin, B.; Gendron, L.; Dory, Y. L. Synthesis of Gly- ψ [(Z)CF=CH]-Phe, a Fluoroalkene Dipeptide Isostere, and Its Incorporation into a Leu-Enkephalin Peptidomimetic. *ACS Chem. Neurosci.* **2017**, *8* (1), 40–49.
- 247 Wilkes, B. C.; Schiller, P. W. Conformation-Activity Relationships of Cyclic Dermorphin Analogues. *Biopolymers* **1990**, *29* (1), 89–95.
- 248 Wilkes, B. C.; Schiller, P. W. Comparative Conformational Analysis of [D-Pen²,D-Pen⁵]Enkephalin (DPDPE): A Molecular Mechanics Study. *J. Comput. Aided Mol. Des.* **1991**, *5* (4), 293–302.
- 249 Mierke, D. F.; Lucietto, P.; Goodman, M.; Schiller, P. W. Conformational Studies of Diastereomeric Cyclic Enkephalins by ¹H-NMR and Computer Simulations. *Biopolymers* **1987**, *26* (9), 1573–1586.
- 250 Mierke, D. F.; Said-Nejad, O. E.; Schiller, P. W.; Goodman, M. Enkephalin Analogues Containing Beta-Naphthylalanine at the Fourth Position. *Biopolymers* **1990**, *29* (1), 179–196.
- 251 Yamazaki, T.; Said-Nejad, O. E.; Schiller, P. W.; Goodman, M. Conformational Studies of Stereoisomeric 14-Membered Cyclic Enkephalin Analogues Containing 1-Naphthylalanine at the Fourth Position: Chirality Effect of Leucine at the Fifth Position on Biological Activity and Receptor Selectivity. *Biopolymers* **1991**, *31* (7), 877–898.

- 252 Bella Ndong D, Blais V, Holleran BJ, et al. Exploration of the fifth position of leu-enkephalin and its role in binding and activating delta (DOP) and mu (MOP) opioid receptors. *Peptide Science*. **2018**;e24070
- 253 Dao, T. T. H. Conception et synthèse de macrocycles pouvant s'empiler en nanotubes supramoléculaires ou agir comme agonistes opioïde delta. **2017**.
- 254 Kopysov, V.; Boyarkin, O. V. Resonance Energy Transfer Relates the Gas-Phase Structure and Pharmacological Activity of Opioid Peptides. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, 55 (2), 689–692.
- 255 Merrifield, R. B. Solid-Phase Peptide Synthesis. In *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*; Wiley: Hoboken, NJ, USA, 1969; Vol. 32.
- 256 Journal of Medicinal Chemistry. Guidelines for Authors. American Chemical Society 2017.
- 257 Fields, G. B.; Noble, R. L. Solid Phase Peptide Synthesis Utilizing 9-Fluorenylmethoxycarbonyl Amino Acids. *Int. J. Pept. Protein Res.* **1990**, 35 (3), 161–214.
- 258 Cheng, H. C. The Power Issue: Determination of KB or Ki from IC50. A Closer Look at the Cheng-Prusoff Equation, the Schild Plot and Related Power Equations. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* **2001**, 46 (2), 61–71.
- 259 Pfleger, K. D. G.; Eidne, K. A. Illuminating Insights into Protein-Protein Interactions Using Bioluminescence Resonance Energy Transfer (BRET). *Nat. Methods* **2006**, 3 (3), 165–174.
- 260 Audet, N.; Galés, C.; Archer-Lahlou, É.; Vallières, M.; Schiller, P. W.; Bouvier, M.; Pineyro, G. Bioluminescence Resonance Energy Transfer Assays Reveal Ligand-Specific Conformational Changes within Preformed Signaling Complexes Containing δ -Opioid Receptors and Heterotrimeric G Proteins. *J. Biol. Chem.* **2008**, 283 (22), 15078–15088.
- 261 Oner, S. S.; Maher, E. M.; Breton, B.; Bouvier, M.; Blumer, J. B. Receptor-Regulated Interaction of Activator of G-Protein Signaling-4 and G α i. *J. Biol. Chem.* **2010**, 285 (27), 20588–20594.
- 262 Hamdan, F. F.; Rochdi, M. D.; Breton, B.; Fessart, D.; Michaud, D. E.; Charest, P. G.; Laporte, S. A.; Bouvier, M. Unraveling G Protein-Coupled Receptor Endocytosis Pathways Using Real-Time Monitoring of Agonist-Promoted Interaction between β -Arrestins and AP-2. *J. Biol. Chem.* **2007**, 282 (40), 29089–29100.
- 263 Charest, P. G.; Terrillon, S.; Bouvier, M. Monitoring Agonist-Promoted Conformational Changes of β -Arrestin in Living Cells by Intramolecular BRET. *EMBO Rep.* **2005**, 6 (4), 334–340.
- 264 Schann, S.; Bouvier, M.; Neuville, P. Technology Combination to Address GPCR Allosteric Modulator Drug-Discovery Pitfalls. *Drug Discov. Today Technol.* **2013**, 10 (2), e261–e267.

- 265 Daly, J. W. Forskolin, Adenylate Cyclase, and Cell Physiology: An Overview. *Adv. Cyclic Nucleotide Protein Phosphorylation Res.* **1984**, 17, 81–89.
- 266 Chemical Computing Group Inc. Molecular Operating Environment (MOE), 2013.08, 2017.
- 267 Kumar, P.; Reithofer, V.; Reisinger, M.; Wallner, S.; Pavkov-Keller, T.; Macheroux, P.; Gruber, K. Substrate Complexes of Human Dipeptidyl Peptidase III Reveal the Mechanism of Enzyme Inhibition. *Sci. Rep.* **2016**, 6, srep23787.
- 268 Pajouhesh, H.; Lenz, G. R. Medicinal Chemical Properties of Successful Central Nervous System Drugs. *NeuroRx J. Am. Soc. Exp. Neurother.* **2005**, 2 (4), 541–553
- 269 Herr, R. J. 5-Substituted-1H-Tetrazoles as Carboxylic Acid Isosteres: Medicinal Chemistry and Synthetic Methods. *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, 10 (11), 3379–3393.
- 270 Tominey, A. F.; Docherty, P. H.; Rosair, G. M.; Quenardelle, R.; Kraft, A. Unusually Weak Binding Interactions in Tetrazole-Amidine Complexes. *Org. Lett.* **2006**, 8 (7), 1279–1282.
- 271 Peters, L.; Fröhlich, R.; Boyd, A. S.; Kraft, A. Noncovalent Interactions between Tetrazole and an N,N'-Diethyl-Substituted Benzamidine. *J. Org. Chem.* **2001**, 66 (10), 3291–3298.
- 272 Manturewicz, M.; Kosson, P.; Grzonka, Z. Syntheses of Fmoc-Alfa-Aminoalkyltetrazoles and Tetrazole Analogue of Leu-Enkephalin. *Pol. J. Chem.* **2007**, Vol. 81 (nr 7), 1327–1334.
- 273 Seizinger, B. R.; Höllt, V.; Herz, A. Evidence for an Opiate-Inactive N-Acetylated Derivative of Leucine-Enkephalin in the Rat Neurointermediate Pituitary. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1981**, 101 (1), 289–297.
- 274 Kumagai, A. K.; Eisenberg, J. B.; Pardridge, W. M. Absorptive-Mediated Endocytosis of Cationized Albumin and a Beta-Endorphin-Cationized Albumin Chimeric Peptide by Isolated Brain Capillaries. Model System of Blood-Brain Barrier Transport. *J. Biol. Chem.* **1987**, 262 (31), 15214–15219.
- 275 Hau, V. S.; Huber, J. D.; Campos, C. R.; Lipkowski, A. W.; Misicka, A.; Davis, T. P. Effect of Guanidino Modification and Proline Substitution on the in Vitro Stability and Blood–brain Barrier Permeability of Endomorphin II. *J. Pharm. Sci.* **2002**, 91 (10), 2140–2149.
- 276 Weltrowska, G.; Nguyen, T. M.-D.; Chung, N. N.; Wilkes, B. C.; Schiller, P. W. N-Terminal Guanidinylation of TIPP (Tyr-Tic-Phe-Phe) Peptides Results in Major Changes of the Opioid Activity Profile. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, 23 (18), 5082–5085.
- 277 Bańkowski, K.; Michalak, O. M.; Leśniak, A.; Filip, K. E.; Cmoch, P.; Szewczuk, Z.; Stefanowicz, P.; Izdebski, J. N-Terminal Guanidinylation of the Cyclic 1,4-Ureido-Deltorphin Analogues: The

Synthesis, Receptor Binding Studies, and Resistance to Proteolytic Digestion. *J. Pept. Sci.* **2015**, *21* (6), 467–475.

- 278 Sureshbabu, V. V.; Venkataramanarao, R.; Naik, S. A.; Chennakrishnareddy, G. Synthesis of Tetrazole Analogues of Amino Acids Using Fmoc Chemistry: Isolation of Amino Free Tetrazoles and Their Incorporation into Peptides. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48* (39), 7038–7041.
- 279 Bionda, N.; Pitteloud, J.-P.; Pitteloud, J.-P.; Cudic, P. Solid-Phase Synthesis of Fusaricidin/Li-f Class of Cyclic Lipopeptides: Guanidinylation of Resin-Bound Peptidyl Amines. *Pept. Sci.* **2013**, *100* (2), 160–166.
- 280 Stawikowski, M.; Cudic, P. A Novel Strategy for the Solid-Phase Synthesis of Cyclic Lipodepsipeptides. *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47* (48), 8587–8590.
- 281 Diss, M. L.; Kennan, A. J. Orthogonal Recognition in Dimeric Coiled Coils via Buried Polar-Group Modulation. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130* (4), 1321–1327.
- 282 Yong, Y. F.; Kowalski, J. A.; Thoen, J. C.; Lipton, M. A. A New Reagent for Solid and Solution Phase Synthesis of Protected Guanidines from Amines. *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40* (1), 53–56.
- 283 Ohara, K.; Vasseur, J.-J.; Smietana, M. NIS-Promoted Guanylation of Amines. *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50* (13), 1463–1465.
- 284 Clark, D. E. In Silico Prediction of Blood–brain Barrier Permeation. *Drug Discov. Today* **2003**, *8* (20), 927–933.
- 285 Kowol, C. R.; Miklos, W.; Pfaff, S.; Hager, S.; Kallus, S.; Pelivan, K.; Kubanik, M.; Enyedy, É. A.; Berger, W.; Heffeter, P.; et al. Impact of Stepwise NH₂-Methylation of Triapine on the Physicochemical Properties, Anticancer Activity, and Resistance Circumvention. *J. Med. Chem.* **2016**, *59* (14), 6739–6752.
- 286 Donovan, S. F.; Pescatore, M. C. Method for Measuring the Logarithm of the Octanol–water Partition Coefficient by Using Short Octadecyl–poly(Vinyl Alcohol) High-Performance Liquid Chromatography Columns. *J. Chromatogr. A* **2002**, *952* (1), 47–61.
- 287 Avdeef, A.; Barrett, D. A.; Shaw, P. N.; Knaggs, R. D.; Davis, S. S. Octanol–, Chloroform–, and Propylene Glycol Dipelargonat–Water Partitioning of Morphine-6-Glucuronide and Other Related Opiates. *J. Med. Chem.* **1996**, *39* (22), 4377–4381.
- 288 Ertl, P.; Rohde, B.; Selzer, P. Fast Calculation of Molecular Polar Surface Area as a Sum of Fragment-Based Contributions and Its Application to the Prediction of Drug Transport Properties. *J. Med. Chem.* **2000**, *43* (20), 3714–3717.

- 289 Veber, D. F.; Johnson, S. R.; Cheng, H.-Y.; Smith, B. R.; Ward, K. W.; Kopple, K. D. Molecular Properties That Influence the Oral Bioavailability of Drug Candidates. *J. Med. Chem.* **2002**, *45* (12), 2615–2623.
- 290 Nielsen, D. S.; Shepherd, N. E.; Xu, W.; Lucke, A. J.; Stoermer, M. J.; Fairlie, D. P. Orally Absorbed Cyclic Peptides. *Chem. Rev.* **2017**, *117* (12), 8094–8128.
- 291 Ballet, S.; Misicka, A.; Kosson, P.; Lemieux, C.; Chung, N. N.; Schiller, P. W.; Lipkowski, A. W.; Tourwé, D. Blood–Brain Barrier Penetration by Two Dermorphin Tetrapeptide Analogues: Role of Lipophilicity vs Structural Flexibility. *J. Med. Chem.* **2008**, *51* (8), 2571–2574.
- 292 Hopkins, A. L.; Keserü, G. M.; Leeson, P. D.; Rees, D. C.; Reynolds, C. H. The Role of Ligand Efficiency Metrics in Drug Discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2014**, *13* (2), nrd4163.
- 293 Poras, H.; Bonnard, E.; Dangé, E.; Fournié-Zaluski, M.-C.; Roques, B. P. New Orally Active Dual Enkephalinase Inhibitors (DENKIs) for Central and Peripheral Pain Treatment. *J. Med. Chem.* **2014**, *57* (13), 5748–5763.
- 294 Shenderovich, M. D.; Liao, S.; Qian, X.; Hruby, V. J. A Three-Dimensional Model of the δ -Opioid Pharmacophore: Comparative Molecular Modeling of Peptide and Nonpeptide Ligands. *Biopolymers* **2000**, *53* (7), 565–580.
- 295 Pawlak, D.; Oleszczuk, M.; Wójcik, J.; Pachulska, M.; Chung, N. N.; Schiller, P. W.; Izdebski, J. Highly Potent Side-Chain to Side-Chain Cyclized Enkephalin Analogues Containing a Carbonyl Bridge: Synthesis, Biology and Conformation. *J. Pept. Sci.* **2001**, *7* (3), 128–140.
- 296 Schiller, P. W.; Eggimann, B.; Nguyen, T. M.-D. Comparative Structure-Function Studies with Analogs of Dynorphin-(1–13) and [Leu5] Enkephalin. *Life Sci.* **1982**, *31* (16), 1777–1780.
- 297 Schiller, P. W.; Nguyen, T. M.-D.; DiMaio, J.; Lemieux, C. Comparison of μ -, δ - and κ -Receptor Binding Sites through Pharmacologic Evaluation of p-Nitrophenylalanine Analogs of Opioid Peptides. *Life Sci.* **1983**, *33* (Supplement 1), 319–322.
- 298 Rosa, M.; Caltabiano, G.; Barreto-Valer, K.; Gonzalez-Nunez, V.; Gómez-Tamayo, J. C.; Ardá, A.; Jiménez-Barbero, J.; Pardo, L.; Rodríguez, R. E.; Arsequell, G.; et al. Modulation of the Interaction between a Peptide Ligand and a G Protein-Coupled Receptor by Halogen Atoms. *ACS Med. Chem. Lett.* **2015**, *6* (8), 872–876.
- 299 Dalvit Claudio; Invernizzi Christian; Vulpetti Anna. Fluorine as a Hydrogen-Bond Acceptor: Experimental Evidence and Computational Calculations. *Chem. Eur. J.* **2014**, *20* (35), 11058–11068.

- 300 Auffinger, P.; Hays, F. A.; Westhof, E.; Ho, P. S. Halogen Bonds in Biological Molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**, *101* (48), 16789–16794.
- 301 Hansch, C.; Fujita, T. P- σ - π Analysis. A Method for the Correlation of Biological Activity and Chemical Structure. *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, *86* (8), 1616–1626.
- 302 Fujita, T.; Iwasa, J.; Hansch, C. A New Substituent Constant, π , Derived from Partition Coefficients. *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, *86* (23), 5175–5180.
- 303 Verma, J.; Khedkar, V. M.; Coutinho, E. C. 3D-QSAR in Drug Design--a Review. *Curr. Top. Med. Chem.* **2010**, *10* (1), 95–115.
- 304 Leo, A.; Jow, P. Y. C.; Silipo, C.; Hansch, C. Calculation of Hydrophobic Constant (Log P) from .Pi. and f Constants. *J. Med. Chem.* **1975**, *18* (9), 865–868.
- 305 Taft, R. W. Polar and Steric Substituent Constants for Aliphatic and O-Benzoate Groups from Rates of Esterification and Hydrolysis of Esters1. *J. Am. Chem. Soc.* **1952**, *74* (12), 3120–3128
- 306 Hansch, C.; Leo, A.; Taft, R. W. A Survey of Hammett Substituent Constants and Resonance and Field Parameters. *Chem. Rev.* **1991**, *91* (2), 165–195.
- 307 Hansch, C. Quantitative Approach to Biochemical Structure-Activity Relationships. *Acc. Chem. Res.* **1969**, *2* (8), 232–239.
- 308 Topliss, J. G. Utilization of Operational Schemes for Analog Synthesis in Drug Design. *J. Med. Chem.* **1972**, *15* (10), 1006–1011.
- 309 Topliss, J. G. A Manual Method for Applying the Hansch Approach to Drug Design. *J. Med. Chem.* **1977**, *20* (4), 463–469.
- 310 Cavallo, G.; Metrangolo, P.; Milani, R.; Pilati, T.; Priimagi, A.; Resnati, G.; Terraneo, G. The Halogen Bond. *Chem. Rev.* **2016**, *116* (4), 2478–2601.
- 311 Batsanov, S. S. Van Der Waals Radii of Elements. *Inorg. Mater.* **2001**, *37* (9), 871–885.
- 312 Lommerse, J. P. M.; Stone, A. J.; Taylor, R.; Allen, F. H. The Nature and Geometry of Intermolecular Interactions between Halogens and Oxygen or Nitrogen. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118* (13), 3108–3116.
- 313 Ouvrard, C.; Le Questel, J.-Y.; Berthelot, M.; Laurence, C. Halogen-Bond Geometry: A Crystallographic Database Investigation of Dihalogen Complexes. *Acta Crystallogr. B* **2003**, *59* (4), 512–526.
- 314 Hruby, V. J.; Bartosz-Bechowski, H.; Davis, P.; Slaninova, J.; Zalewska, T.; Stropova, D.; Porreca, F.; Yamamura, H. I. Cyclic Enkephalin Analogues with Exceptional Potency and Selectivity for δ -Opioid Receptors. *J. Med. Chem.* **1997**, *40* (24), 3957–3962.

- ³¹⁵ Pye, C. R.; Hewitt, W. M.; Schwochert, J.; Haddad, T. D.; Townsend, C. E.; Etienne, L.; Lao, Y.; Limberakis, C.; Furukawa, A.; Mathiowetz, A. M.; et al. Nonclassical Size Dependence of Permeation Defines Bounds for Passive Adsorption of Large Drug Molecules. *J. Med. Chem.* **2017**, *60* (5), 1665–1672
- ³¹⁶ Rezai, T.; Bock, J. E.; Zhou, M. V.; Kalyanaraman, C.; Lokey, R. S.; Jacobson, M. P. Conformational Flexibility, Internal Hydrogen Bonding, and Passive Membrane Permeability: Successful in Silico Prediction of the Relative Permeabilities of Cyclic Peptides. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128* (43), 14073–14080.
- ³¹⁷ Whitty, A.; Zhong, M.; Viarengo, L.; Beglov, D.; Hall, D. R.; Vajda, S. Quantifying the Chameleonic Properties of Macrocycles and Other High-Molecular-Weight Drugs. *Drug Discov. Today* **2016**, *21* (5), 712–717.
- ³¹⁸ Price, D. A.; Mathiowetz, A. M.; Liras, S. Designing Orally Bioavailable Peptide and Peptoid Macrocycles. In *Practical Medicinal Chemistry with Macrocycles*; Ericrsault, Peterson, rk L., Eds.; John Wiley & Sons, Inc., 2017; pp 59–76.
- ³¹⁹ Schiller, P. W.; Berezowska, I.; Nguyen, T. M.-D.; Schmidt, R.; Lemieux, C.; Chung, N. N.; Falcone-Hindley, M. L.; Yao, W.; Liu, J.; Iwama, S.; et al. Novel Ligands Lacking a Positive Charge for the δ - and μ -Opioid Receptors. *J. Med. Chem.* **2000**, *43* (4), 551–559.
- ³²⁰ Lu, Y.; Nguyen, T. M.-D.; Weltrowska, G.; Berezowska, I.; Lemieux, C.; Chung, N. N.; Schiller, P. W. [2',6'-Dimethyltyrosine]Dynorphin A(1–11)-NH₂ Analogues Lacking an N-Terminal Amino Group: Potent and Selective κ Opioid Antagonists. *J. Med. Chem.* **2001**, *44* (19), 3048–3053.
- ³²¹ Schiller, P. W.; Weltrowska, G.; Nguyen, T. M.-D.; Lemieux, C.; Chung, N. N.; Lu, Y. Conversion of δ -, κ - and μ -Receptor Selective Opioid Peptide Agonists into δ -, κ - and μ -Selective Antagonists. *Life Sci.* **2003**, *73* (6), 691–698.
- ³²² Vig, B. S.; Murray, T. F.; Aldrich, J. V. A Novel N-Terminal Cyclic Dynorphin A Analogue CycloN₅[Trp₃,Trp₄,Glu₅] Dynorphin A-(1–11)NH₂ That Lacks the Basic N-Terminus. *J. Med. Chem.* **2003**, *46* (8), 1279–1282.
- ³²³ Vig, B. S.; Murray, T. F.; Aldrich, J. V. Synthesis and Opioid Activity of Side-Chain-to-Side-Chain Cyclic Dynorphin A-(1–11) Amide Analogues Cyclized between Positions 2 and 5. 1. Substitutions in Position 3. *J. Med. Chem.* **2004**, *47* (2), 446–455.
- ³²⁴ Cardillo, G.; Gentilucci, L.; Tolomelli, A.; Spinosa, R.; Calienni, M.; Qasem, A. R.; Spampinato, S. Synthesis and Evaluation of the Affinity toward μ -Opioid Receptors of Atypical, Lipophilic

- Ligands Based on the Sequence c[-Tyr-Pro-Trp-Phe-Gly-]. *J. Med. Chem.* **2004**, 47 (21), 5198–5203.
- 325 Gentilucci, L.; Squassabia, F.; Demarco, R.; Artali, R.; Cardillo, G.; Tolomelli, A.; Spampinato, S.; Bedini, A. Investigation of the Interaction between the Atypical Agonist c[YpwFG] and MOR. *FEBS J.* **2008**, 275 (9), 2315–2337.
- 326 R  thrich, H.-L.; Grecksch, G.; Schmidt, R.; Neubert, K. Linear and Cyclic β -Casomorphin Analogues with High Analgesic Activity. *Peptides* **1992**, 13 (3), 483–485.
- 327 Pil, J.; Van der Veken, P.; Bal, G.; Augustyns, K.; Haemers, A.; Tytgat, J. Synthesis and Electrophysiological Characterization of Cyclic Morphiceptin Analogues. *Biochem. Pharmacol.* **2004**, 67 (10), 1887–1895.
- 328 DiMaio, J.; Nguyen, T. M. D.; Lemieux, C.; Schiller, P. W. Synthesis and Pharmacological Characterization in Vitro of Cyclic Enkephalin Analogs: Effect of Conformational Constraints on Opiate Receptor Selectivity. *J. Med. Chem.* **1982**, 25 (12), 1432–1438.
- 329 Schiller, P. W.; Nguyen, T. M.-D. Activity Profiles of Novel Side-Chain to Side-Chain Cyclized Opioid Peptide Analogs. *Neuropeptides* **1984**, 5 (1), 165–168.
- 330 Schiller, P. W.; Nguyen, T. M.-D.; Lemieux, C.; Maziak, L. A. A Novel Side-Chain-Linked Antiparallel Cyclic Dimer of Enkephalin. *FEBS Lett.* **1985**, 191 (2), 231–234.
- 331 Schiller, P. W.; Weltrowska, G.; Nguyen Thi Mai Dung; Lemieux, C.; Chung, N. N.; Marsden, B. J.; Wilkes, B. C. Conformational Restriction of the Phenylalanine Residue in a Cyclic Opioid Peptide Analog: Effects on Receptor Selectivity and Stereospecificity. *J. Med. Chem.* **1991**, 34 (10), 3125–3132.
- 332 Perlikowska, R.; do-Rego, J. C.; Cravezic, A.; Fichna, J.; Wyrebska, A.; Toth, G.; Janecka, A. Synthesis and Biological Evaluation of Cyclic Endomorphin-2 Analogs. *Peptides* **2010**, 31 (2), 339–345.
- 333 Piekialna, J.; Kluczyk, A.; Gentilucci, L.; Cerlesi, M. C.; Calo', G.; Tomb  ly, C.; Łapi  ski, K.; Janecki, T.; Janecka, A. Ring Size in Cyclic Endomorphin-2 Analogs Modulates Receptor Binding Affinity and Selectivity. *Org. Biomol. Chem.* **2015**, 13 (21), 6039–6046.
- 334 Rew, Y.; Malkmus, S.; Svensson, C.; Yaksh, T. L.; Chung, N. N.; Schiller, P. W.; Cassel, J. A.; DeHaven, R. N.; Goodman, M. Synthesis and Biological Activities of Cyclic Lanthionine Enkephalin Analogues: δ -Opioid Receptor Selective Ligands. *J. Med. Chem.* **2002**, 45 (17), 3746–3754.

- 335 Mollica, A.; Guardiani, G.; Davis, P.; Ma, S.-W.; Porreca, F.; Lai, J.; Mannina, L.; Sobolev, A. P.; Hruby, V. J. Synthesis of Stable and Potent δ/μ Opioid Peptides: Analogues of H-Tyr-c[d-Cys-Gly-Phe-d-Cys]-OH by Ring-Closing Metathesis. *J. Med. Chem.* **2007**, *50* (13), 3138–3142.
- 336 Berezowska, I.; Chung, N. N.; Lemieux, C.; Wilkes, B. C.; Schiller, P. W. Dicarba Analogues of the Cyclic Enkephalin Peptides H-Tyr-c[d-Cys-Gly-Phe-d(or l)-Cys]NH₂ Retain High Opioid Activity. *J. Med. Chem.* **2007**, *50* (6), 1414–1417.
- 337 Stefanucci, A.; Novellino, E.; Mirzaie, S.; Macedonio, G.; Pieretti, S.; Minosi, P.; Szűcs, E.; Erdei, A. I.; Zádor, F.; Benyhe, S.; et al. Opioid Receptor Activity and Analgesic Potency of DPDPE Peptide Analogues Containing a Xylene Bridge. *ACS Med. Chem. Lett.* **2017**, *8* (4), 449–454.
- 338 Li, H.; Aneja, R.; Chaiken, I. Click Chemistry in Peptide-Based Drug Design. *Molecules* **2013**, *18* (8), 9797–9817.
- 339 Castro, V.; Rodríguez, H.; Albericio, F. CuAAC: An Efficient Click Chemistry Reaction on Solid Phase. *ACS Comb. Sci.* **2016**, *18* (1), 1–14.
- 340 Johansson, J. R.; Beke-Somfai, T.; Said Stålsmeden, A.; Kann, N. Ruthenium-Catalyzed Azide Alkyne Cycloaddition Reaction: Scope, Mechanism, and Applications. *Chem. Rev.* **2016**, *116* (23), 14726–14768.
- 341 Ingale, S.; Dawson, P. E. On Resin Side-Chain Cyclization of Complex Peptides Using CuAAC. *Org. Lett.* **2011**, *13* (11), 2822–2825.
- 342 Empting, M.; Avrutina, O.; Meusinger, R.; Fabritz, S.; Reinwarth, M.; Biesalski, M.; Voigt, S.; Buntkowsky, G.; Kolmar, H. “Triazole Bridge”: Disulfide-Bond Replacement by Ruthenium-Catalyzed Formation of 1,5-Disubstituted 1,2,3-Triazoles. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50* (22), 5207–5211.
- 343 Heard, K. R.; Wu, W.; Li, Y.; Zhao, P.; Woznica, I.; Lai, J. H.; Beinborn, M.; Sanford, D. G.; Dimare, M. T.; Chiluwal, A. K.; et al. A General Method for Making Peptide Therapeutics Resistant to Serine Protease Degradation: Application to Dipeptidyl Peptidase IV Substrates. *J. Med. Chem.* **2013**, *56* (21), 8339–8351.
- 344 Frymoyer, J. W.; Newberg, A.; Pope, M. H.; Wilder, D. G.; Clements, J.; Macpherson, B. Spine Radiographs in Patients with Low-Back Pain. An Epidemiological Study in Men. *J. Bone Jt. Surg.* **1984**, *66* (7), 1048–1055.
- 345 Bedson, J.; Croft, P. R. The Discordance between Clinical and Radiographic Knee Osteoarthritis: A Systematic Search and Summary of the Literature. *BMC Musculoskelet. Disord.* **2008**, *9*, 116
- 346 Melzack, R. From the Gate to the Neuromatrix. *Pain* **1999**, *Suppl 6*, S121–126.

- 347 Apkarian, A. V.; Baliki, M. N.; Geha, P. Y. Towards a Theory of Chronic Pain. *Prog. Neurobiol.* **2009**, *87* (2), 81–97.
- 348 Watson, A.; Power, A.; Brown, C.; El-Deredy, W.; Jones, A. Placebo Analgesia: Cognitive Influences on Therapeutic Outcome. *Arthritis Res. Ther.* **2012**, *14* (2), 206.
- 349 Goldstein, R. Z.; Volkow, N. D. Dysfunction of the Prefrontal Cortex in Addiction: Neuroimaging Findings and Clinical Implications. *Nat. Rev. Neurosci.* **2011**, *12* (11), 652–669.
- 350 Hammers, A.; Asselin, M.-C.; Hinz, R.; Kitchen, I.; Brooks, D. J.; Duncan, J. S.; Koepp, M. J. Upregulation of Opioid Receptor Binding Following Spontaneous Epileptic Seizures. *Brain* **2007**, *130* (4), 1009–1016.
- 351 Lutz, P.-E.; Kieffer, B. L. Opioid Receptors: Distinct Roles in Mood Disorders. *Trends Neurosci.* **2013**, *36* (3), 195–206.
- 352 Parens, E.; Johnston, J. Neuroimaging: Beginning to Appreciate Its Complexities. *Hastings Cent. Rep.* **2014**, *Spec No*, S2-7.
- 353 Apkarian, A. V.; Bushnell, M. C.; Treede, R.-D.; Zubieta, J.-K. Human Brain Mechanisms of Pain Perception and Regulation in Health and Disease. *Eur. J. Pain Lond. Engl.* **2005**, *9* (4), 463–484.
- 354 Fox, P. T.; Raichle, M. E. Focal Physiological Uncoupling of Cerebral Blood Flow and Oxidative Metabolism during Somatosensory Stimulation in Human Subjects. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1986**, *83* (4), 1140–1144.
- 355 Thulborn, K. R.; Waterton, J. C.; Matthews, P. M.; Radda, G. K. Oxygenation Dependence of the Transverse Relaxation Time of Water Protons in Whole Blood at High Field. *Biochim. Biophys. Acta* **1982**, *714* (2), 265–270.
- 356 Morton, D. L.; Sandhu, J. S.; Jones, A. K. Brain Imaging of Pain: State of the Art. *J. Pain Res.* **2016**, *9*, 613–624.
- 357 Owen, D. G.; Bureau, Y.; Thomas, A. W.; Prato, F. S.; St Lawrence, K. S. Quantification of Pain-Induced Changes in Cerebral Blood Flow by Perfusion MRI. *Pain* **2008**, *136* (1–2), 85–96.
- 358 Kato, Y.; Araki, N.; Matsuda, H.; Ito, Y.; Suzuki, C. Arterial Spin-Labeled MRI Study of Migraine Attacks Treated with Rizatriptan. *J. Headache Pain* **2010**, *11* (3), 255–258.
- 359 Phelps, M. E. Positron Computed Tomography Studies of Cerebral Glucose Metabolism in Man: Theory and Application in Nuclear Medicine. *Semin. Nucl. Med.* **1981**, *11* (1), 32–49.
- 360 Jones, A. K.; Brown, W. D.; Friston, K. J.; Qi, L. Y.; Frackowiak, R. S. Cortical and Subcortical Localization of Response to Pain in Man Using Positron Emission Tomography. *Proc. Biol. Sci.* **1991**, *244* (1309), 39–44.

- 361 Wehrl, H. F.; Hossain, M.; Lankes, K.; Liu, C.-C.; Bezrukov, I.; Martirosian, P.; Schick, F.; Reischl, G.; Pichler, B. J. Simultaneous PET-MRI Reveals Brain Function in Activated and Resting State on Metabolic, Hemodynamic and Multiple Temporal Scales. *Nat. Med.* **2013**, *19* (9), 1184–1189.
- 362 Henriksen, G.; Willoch, F. Imaging of Opioid Receptors in the Central Nervous System. *Brain J. Neurol.* **2008**, *131* (Pt 5), 1171–1196.
- 363 Chiaravalloti, A.; Ursini, F.; Fiorentini, A.; Barbagallo, G.; Martorana, A.; Koch, G.; Tavolozza, M.; Schillaci, O. Functional Correlates of TSH, FT3 and FT4 in Alzheimer Disease: A F-18 FDG PET/CT Study. *Sci. Rep.* **2017**, *7* (1), 6220.
- 364 Ellen, S. R.; Morris, P. L. P.; Olver, J. S.; Reutens, D.; Norman, T. R.; Tochon-Danguy, H. J.; Constant, E.; Ignatiadis, S.; McFarlane, A. C.; Egan, G. F.; et al. A Positron Emission Tomography Study of Benzodiazepine Receptors in Post-Traumatic Stress Disorder. *Aust. N. Z. J. Psychiatry* **2000**, *34* (sup1), A21–A21.
- 365 Naganawa, M.; Jacobsen, L. K.; Zheng, M.-Q.; Lin, S.-F.; Banerjee, A.; Byon, W.; Weinzimmer, D.; Tomasi, G.; Nabulsi, N.; Grimwood, S.; et al. Evaluation of the Agonist PET Radioligand [¹¹C]GR103545 to Image Kappa Opioid Receptor in Humans: Kinetic Model Selection, Test-Retest Reproducibility and Receptor Occupancy by the Antagonist PF-04455242. *NeuroImage* **2014**, *99*, 69–79.
- 366 Use of Positron Emission Tomography in Analysing Receptor Function in Vivo. *Toxicol. Lett.* **2001**, *120* (1–3), 243–251.
- 367 Madar, I.; Lever, J. R.; Kinter, C. M.; Scheffel, U.; Ravert, H. T.; Musachio, J. L.; Mathews, W. B.; Dannals, R. F.; Frost, J. J. Imaging of Delta Opioid Receptors in Human Brain by N1'-([¹¹C]Methyl)Naltrindole and PET. *Synap. N. Y. N* **1996**, *24* (1), 19–28.
- 368 Smith, J. S.; Zubieta, J. K.; Price, J. C.; Flesher, J. E.; Madar, I.; Lever, J. R.; Kinter, C. M.; Dannals, R. F.; Frost, J. J. Quantification of Delta-Opioid Receptors in Human Brain with N1'-([¹¹C]Methyl) Naltrindole and Positron Emission Tomography. *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* **1999**, *19* (9), 956–966.
- 369 Ryu, E. K.; Wu, Z.; Chen, K.; Lazarus, L. H.; Ewa, D. M.; Sasaki, Y.; Ambo, A.; Salvadori, S.; Ren, C.; Zhao, H.; et al. Synthesis of a Potent and Selective 18F-Labeled δ -Opioid Receptor Antagonist Derived from the Dmt-Tic Pharmacophore for Positron Emission Tomography Imaging. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, (6), 1817-1823

- 370 Pirisedigh, A.; Blais, V.; Ait-Mohand, S.; Abdallah, K.; Holleran, B. J.; Leduc, R.; Dory, Y. L.; Gendron, L.; Guérin, B. Synthesis and Evaluation of a ^{64}Cu -Conjugate, a Selective δ -Opioid Receptor Positron Emission Tomography Imaging Agent. *Org. Lett.*, **2017**, *19* (8), pp 2018–2021
- 371 Schiller, P. W.; Nguyen, T. M.; Weltrowska, G.; Wilkes, B. C.; Marsden, B. J.; Lemieux, C.; Chung, N. N. Differential Stereochemical Requirements of Mu vs. Delta Opioid Receptors for Ligand Binding and Signal Transduction: Development of a Class of Potent and Highly Delta-Selective Peptide Antagonists. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1992**, *89* (24), 11871–11875.
- 372 Strominger, D.; Hollander, J. M.; Seaborg, G. T. Table of Isotopes. *Rev. Mod. Phys.* **1958**, *30* (2), 585–904.
- 373 Zhang, M.-R.; Tsuchiyama, A.; Haradahira, T.; Yoshida, Y.; Furutsuka, K.; Suzuki, K. Development of an Automated System for Synthesizing ^{18}F -Labeled Compounds Using ^{18}F Fluoroethyl Bromide as a Synthetic Precursor. *Appl. Radiat. Isot. Data Instrum. Methods Use Agric. Ind. Med.* **2002**, *57* (3), 335–342.
- 374 Peters, T.; Vogg, A.; Oppel, I. M.; Schmaljohann, J. Simple and Efficient Synthesis of 2- ^{18}F Fluoroethyl Triflate for High Yield ^{18}F Fluoroethylation. *Appl. Radiat. Isot. Data Instrum. Methods Use Agric. Ind. Med.* **2014**, *94*, 141–146.
- 375 Nodwell, M. B.; Yang, H.; Čolović, M.; Yuan, Z.; Merkens, H.; Martin, R. E.; Bénard, F.; Schaffer, P.; Britton, R. ^{18}F -Fluorination of Unactivated C–H Bonds in Branched Aliphatic Amino Acids: Direct Synthesis of Oncological Positron Emission Tomography Imaging Agents. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139* (10), 3595–3598.

ANNEXE 1 : PARTIE EXPÉRIMENTALE

Remarques générales

Toutes les réactions ont été effectuées sous atmosphère d'azote dans de la verrerie séchée à la flamme sous pression réduite. Les solvants anhydres et certains réactifs liquides ont été distillés avant leur utilisation, et ils sont rapportés dans le tableau G.1 suivant.

Tableau G.1 : Agents desséchants utilisés pour la distillation de différents solvants et réactifs.

Solvant / Réactif distillé	Agent desséchant
Acétonitrile	Hydrure de calcium
Anhydride trifluorométhanesulfonique	P ₂ O ₅
Benzène	Hydrure de calcium
Dichlorométhane	Hydrure de calcium
<i>N,N</i> -Diisopropylamine	Hydrure de calcium
Éther diéthylique	Hydrure de calcium
Méthanol	Mg ⁰ et I ₂
Pyridine	Hydrure de calcium
Tétrahydrofurane	Sodium, Benzophénone
<i>N,N,N</i> -triéthylamine	Hydrure de calcium
Toluène	Hydrure de calcium

Les chromatographies sur couche mince ont été effectuées sur des plaques de verre recouvertes de gel de silice (0.25 mm, Silicyle). Les produits en chromatographie sur couche mince ont été révélés à la lampe UV, puis par trempage dans une solution aqueuse de KMnO₄ ou dans une solution de ninhydrine, suivi d'un chauffage. Les chromatographies éclair ont été effectuées avec du gel de silice (40-63 µm, Silicyle).

Les spectres de résonance magnétique nucléaire ¹H (300 MHz) et ¹³C (75 MHz) ont été enregistrés avec un appareil Bruker AC-300. Les spectres de résonance magnétique nucléaire ¹H (400 MHz) et ¹³C (101 MHz) ont été enregistrés avec un appareil Bruker Ascend 400. L'étalon interne est le chloroforme (δH = 7,26 ppm; δC = 77,2 ppm), le diméthylsulfoxyde (δH = 2,49 ppm; δC = 39,5 ppm), le méthanol (δH = 3,31 ppm; δC = 49,1 ppm) ou l'eau (δH = 4,79 ppm).

Les spectres de masse ont été enregistrés avec un spectromètre VG Micromass ZAB-2F, sur un ESI-Q-ToF (Maxis).

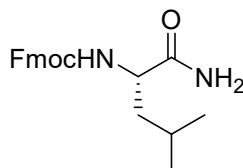
Les angles de rotation optique ont été mesurés à l'aide d'un polarimètre Perkin-Elmer 141.

La pureté des peptides a été déterminée par injection des peptides purifiés dans une HPLC Agilent 1100 series (colonne : Eclipse XDB-C18, 4,6 mm x 250 mm, 5 μ m; solvant A : 0,1 % TFA dans l'eau; solvant B : 0,1 % TFA dans l'acétonitrile; 10-70 % B dans A en 50 min; débit : 1 mL/min; détection UV à 210 nm.

Pour la production des espèces radiomarquées, le ^{18}F a été préparé par la réaction $^{18}\text{O}(\text{p}, \text{n})^{18}\text{F}$ sur de l'eau enrichie en ^{18}O , à l'aide des cibles des cyclotrons TR-19 ou TR-24 (Advanced Cyclotron Systems, inc.) du Centre d'Imagerie Moléculaire de Sherbrooke.

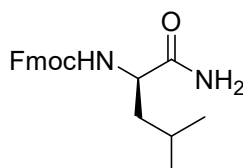
Modes opératoires (en anglais).

(S)-(9H-fluoren-9-yl)methyl (1-amino-4-methyl-1-oxopentan-2-yl)carbamate (10a).



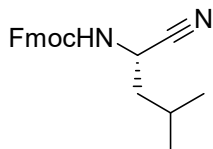
Fmoc-Leu-OH (**1**) (2.00 g; 5.60 mmol; 1.00 eq), Boc anhydride (1.60 g; 7.35 mmol; 1.3 eq) and pyridine (0.28 mL; 3.47 mmol; 0.62 eq) were mixed together in dioxane (7 mL) at room temperature. Then, ammonium carbonate (564 mg; 7.13 mmol; 1.26 eq) was added, and the resulting mixture was stirred at room temperature for 6 h until completion. EtOAc (30 mL) was added, and the organic layer was washed with water (30 mL) and H₂SO₄ (5 %) (30 mL), dried over MgSO₄ and concentrated to dryness. The resulting precipitate was triturated in Et₂O, and was isolated by filtration to yield the title compound as a white solid (1.71 g, 87 %) of pure white solid. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ = 7.91 (d, *J* = 7.5 Hz, 2 H), 7.74 (d, *J* = 7.0 Hz, 2 H), 7.49 - 7.23 (m, 4 H), 6.96 (br. s., 1 H), 4.39 - 4.17 (m, 3 H), 4.03 - 3.89 (m, 1 H), 1.72 - 1.55 (m, 1 H), 1.53 - 1.37 (m, 2 H), 0.88 (dd, *J* = 6.8, 10.1 Hz, 6 H) ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆) δ = 174.9, 156.4, 144.3, 141.2, 128.1, 127.5, 125.8, 120.6, 65.8, 53.4, 47.2, 41.3, 24.8, 23.5, 21.9 **Mp** 189-190 °C (Et₂O) **HRMS** (ESI⁺) *m/z* calcd for C₂₁H₂₄N₂O₃ (M + Na)⁺ 375.1679 found 375.1681 Δ=0.2 mDa. [α]_D²⁰ -10 (c=5, in MeOH).

(R)-(9H-fluoren-9-yl)methyl(1-amino-4-methyl-1-oxopentan-2-yl)carbamate (10b).



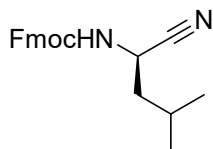
Similar procedure as for **9a** (91 %) ¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ = 7.90 (d, *J* = 7.5 Hz, 2 H), 7.80 - 7.67 (m, 2 H), 7.49 - 7.38 (m, 3 H), 7.38 - 7.24 (m, 3 H), 6.98 (br. s., 1 H), 4.41 - 4.14 (m, 3 H), 4.06 - 3.89 (m, 1 H), 3.52 - 3.29 (m, 1 H), 1.72 - 1.55 (m, 1 H), 1.54 - 1.40 (m, 2 H), 0.88 (dd, *J* = 6.5, 10.5 Hz, 6 H) ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆) δ = 175.0, 156.4, 144.2, 141.2, 128.1, 127.5, 125.8, 120.6, 65.9, 53.4, 47.2, 41.3, 24.7, 23.6, 21.9 **HRMS** (ESI⁺) *m/z* calcd for C₂₁H₂₄N₂O₃ (M + Na)⁺ 375.1679 found 375.1688 Δ=0.9 mDa. [α]_D²⁰ 12 (c=5, MeOH).

(S)-(9H-fluoren-9-yl)methyl(1-cyano-3-methylbutyl)carbamate (11a).



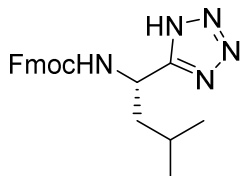
Amide (**2**) (1.56 g; 4.41 mmol; 1 eq) was dissolved in dry THF (10 mL), and pyridine (0.71 mL; 8.82 mmol; 2 eq) was added, then trifluoroacetic anhydride (0.67 mL; 4.85 mmol; 1.1 eq) was added dropwise in order to keep the internal temperature below 5 °C. The mixture was stirred at room temperature during 16 h, and iced-water was added to the reacting mixture. The white precipitate that had formed was isolated by filtration, rinsed three times with cold water and finally recrystallised in a minimum amount of water to give the title compound as a white powder (1.32 g, 89%). ¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ = 7.90 (d, *J* = 7.5 Hz, 2 H), 7.70 (d, *J* = 7.5 Hz, 2 H), 7.47 - 7.39 (m, 2 H), 7.35 (dd, *J* = 1.1, 7.5 Hz, 2 H), 4.44 (d, *J* = 7.0 Hz, 3 H), 4.31 - 4.21 (m, 1 H), 1.64 (br. s., 3 H), 0.88 (t, *J* = 5.9 Hz, 6 H) ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆) δ = 155.9, 144.1, 141.3, 128.1, 127.5, 125.5, 120.6, 120.3, 66.3, 47.1, 41.2, 24.7, 22.4, 22.0 **Mp** 115,7-116,5 (water) **HRMS** (ESI⁺) *m/z* calcd for C₂₁H₂₂N₂O₂ (M + Na)⁺ 357.1573 found 357.1579 Δ=0.6 mDa. [α]_D²⁰ -27 (c=5, MeOH).

(S)-(9H-fluoren-9-yl)methyl(1-cyano-3-methylbutyl)carbamate (11b).



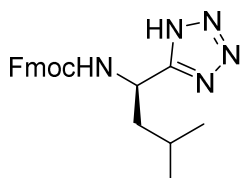
Similar procedure as for **10a** (85 %) ¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ = 8.16 (d, *J* = 7.9 Hz, 1 H), 7.90 (d, *J* = 7.5 Hz, 2 H), 7.70 (d, *J* = 7.3 Hz, 2 H), 7.50 - 7.38 (m, 2 H), 7.38 - 7.26 (m, 2 H), 4.60 - 4.36 (m, 3 H), 4.32 - 4.13 (m, 1 H), 1.77 - 1.54 (m, 3 H), 0.88 (t, *J* = 5.8 Hz, 6 H) ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆) δ = 155.9, 144.1, 141.3, 128.1, 127.5, 125.5, 120.6, 120.3, 66.3, 47.1, 41.2, 40.7, 24.6, 22.4, 22.0 **HRMS** (ESI⁺) *m/z* calcd for C₂₁H₂₂N₂O₂ (M + Na)⁺ 357.1573 found 357.1578 Δ=0.5 mDa. [α]_D²⁰ 31 (c=5, MeOH).

(9H-fluoren-9-yl)methyl (3-methyl-1-(1H-tetrazol-5-yl)butyl)carbamate (12a).



Cyano (**3**) (0.97 g; 2.90 mmol; 1 eq), sodium azide (0.38 g; 5.80 mmol; 2 eq), ZnBr₂ (326.5 mg; 1.45 mmol; 0.5 eq) were mixed together in isopropanol/water (10/25 mL) at room temperature. The mixture heated at 100 °C, and DMF was added until total dissolution. This was refluxed 72 h, and 3N HCl / EtOAc were added until total dissolution of the precipitate. The organic phase was extracted with 3x 40 mL EtOAc, gathered and washed with 50 mL Brine, before being dried over MgSO₄ and concentrated to dryness. The solid was purified via recrystallisation in EtOAc/ Hexane, to give the title compound as a white solid (752.8 mg, 89 %). ¹H NMR (300 MHz ,DMSO-d₆) δ = 8.07 (d, *J* = 8.1 Hz, 1 H), 7.90 (d, *J* = 7.5 Hz, 2 H), 7.72 (t, *J* = 7.3 Hz, 2 H), 7.42 (t, *J* = 6.8 Hz, 2 H), 7.33 (dt, *J* = 3.0, 7.3 Hz, 2 H), 5.03 - 4.87 (m, 1 H), 4.45 - 4.35 (m, 1 H), 4.32 (d, *J* = 6.6 Hz, 1 H), 4.29 - 4.18 (m, 1 H), 1.91 - 1.66 (m, 2 H), 1.65 - 1.50 (m, 1 H), 0.91 (t, *J* = 6.8 Hz, 6 H) ¹³C NMR (75 MHz ,DMSO-d₆) δ = 156.3, 144.2, 141.2, 128.1, 127.5, 125.7, 120.6, 66.1, 47.2, 44.8, 42.2, 24.5, 23.1, 21.9 HRMS (ESI⁺) *m/z* calcd for C₂₁H₂₃N₅O₂ (M + Na)⁺ 400.1744 found 400.1751 Δ=0.7 mDa. [α]_D²⁰ -30 (c=5, MeOH).

(9H-fluoren-9-yl)methyl (3-methyl-1-(1H-tetrazol-5-yl)butyl)carbamate (12b).



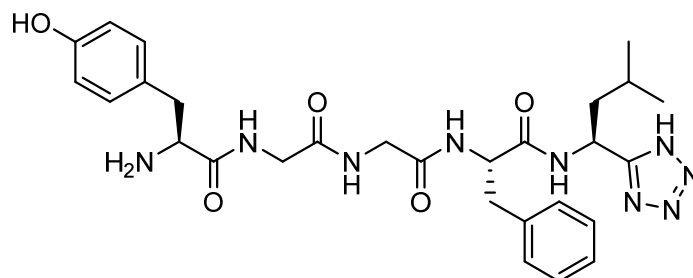
Similar procedure as for **11a** (73 %) ¹H NMR (300 MHz ,DMSO-d₆) δ = 11.21 (br. s., 1 H), 8.10 (d, *J* = 8.1 Hz, 1 H), 7.88 (d, *J* = 7.3 Hz, 2 H), 7.72 (t, *J* = 6.8 Hz, 2 H), 7.46 - 7.36 (m, 2 H), 7.36 - 7.18 (m, 2 H), 5.07 - 4.92 (m, 1 H), 4.55 - 4.10 (m, 3 H), 1.90 - 1.66 (m, 2 H), 1.59 (dt, *J* = 6.5, 13.5 Hz, 1 H), 0.90 (t, *J* = 6.6 Hz, 6 H) ¹³C NMR (75 MHz ,DMSO-d₆) δ = 156.3, 150.4, 144.3, 144.1, 141.2, 128.1, 127.5, 125.7, 120.6, 66.2, 47.2, 44.9, 42.4, 24.6, 23.1, 21.9 HRMS (ESI⁺) *m/z* calcd for C₂₁H₂₃N₅O₂ (M + Na)⁺ 400.1744 found 400.1768 Δ=2.4 mDa. [α]_D²⁰ -27 (c=5, MeOH).

General Method for all peptide Synthesis on Solid Support (Fmoc Methodology).

The resin was washed using DMF (3x), *i*PrOH (3x) and DCM (3x), unless stated otherwise. Loading of the resin: The 2-Cl Trityl resin (0.71mmol/g factory loading) was placed in a sintered glass peptide synthesis vessel. The modified Leu(T) (**4**) (1.2 eq), and DIPEA (4 eq) were added to the resin. The suspension was agitated in a shaker for 16 h. The resin was washed with DCM/MeOH/DIPEA (17/2/1). The loading was measured via mass difference after drying the resin (90 %). After the initial loading, the peptidic sequence was synthesised using solid phase synthesis, with Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Gly-OH or Fmoc-D-Ala-OH and Boc-Tyr-OH. For all Fmoc deprotections the resin was treated with 20% piperidine in DMF and the suspension was agitated in a shaker for 2x5 min. All three couplings were performed using 3 equivalents of protected amino acid, HATU and HoBt-Cl; with 9 equivalents of DIPEA in a minimum volume of DMF and the suspension was agitated in a shaker. All couplings procedures were stopped after 1 h or after the Kaiser's test result was negative. The final peptide was cleaved from the resin (3mL of cleavage solution per 1g of resin) in a glass vial and the suspension was stirred for 3h by agitation on a shaker. Cleavage solution consisted in 95 % TFA, 2.5 % H₂O, 2.5 % TIPS. After cleavage, the mixture was filtered on cotton. The remaining solvents were concentrated under vacuum and dropped in cold Et₂O (15 mL) at 0 °C. The obtained precipitate was centrifuged and the major part of the Et₂O was removed by decantation. The remaining precipitates were dissolved in 30 % aq tBuOH. The final aqueous solution was frozen and lyophilized. The crude peptide was purified using preparative reverse-phase HPLC, detecting at 210 nm, with a C18 column and using ACN gradient in a 0.1% TFA aq solution (gradient varying). The purity of all fractions was analyzed using an analytical HPLC, detecting at 210 nm, with a C18 column. All pure fractions were combined, frozen and lyophilized.

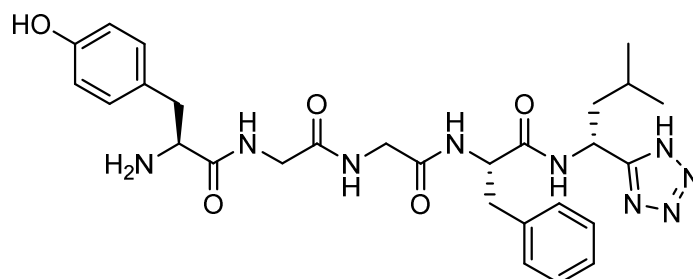
General method for Guanidyl incorporation on solid phase (6**, **7**, **8**).** Fmoc-Tyr(OtBu)-OH was used instead of Boc-Tyr(OtBu)-OH, on the last residue. Fmoc was deprotected on the latter, as described in the previous methodology. After positive Kaiser test, resin was swelled in a minimum of DCM, and a solution of Et₃N (9 eq) and *N,N*-DiBoc-*N*-methylisothioisourea (1.5 eq) in DMF was added. The reactor was shaken for 10 min, before adding HgCl₂ (3 eq) into the solution. The vessel was then agitated for 2h, or until reaction completion, monitor by Kaiser test. It has to be mentioned, that sometimes, reaction needs to be repeated twice to achieve full completion. The peptide is then, deprotected and cleaved from resin, as described before.

Leu(T)enkephalin (2).



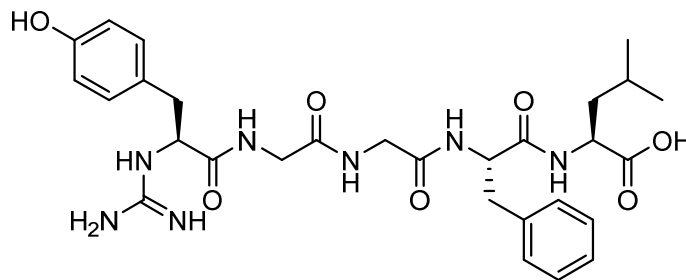
¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ = 8.84 - 8.66 (m, 2 H), 8.19 - 8.11 (m, 2 H), 8.08 - 7.95 (m, 2 H), 7.18 (s, 5 H), 7.11 - 7.01 (m, 2 H), 6.77 - 6.67 (m, 2 H), 5.29 - 5.15 (m, 1 H), 4.60 - 4.48 (m, 1 H), 4.08 - 3.94 (m, 1 H), 3.90 - 3.63 (m, 8 H), 3.08 - 2.93 (m, 2 H), 2.87 - 2.65 (m, 2 H), 1.87 - 1.65 (m, J = 7.4, 13.5, 13.5 Hz, 2 H), 1.52 (quin, J = 6.8 Hz, 1 H), 0.89 (dd, J = 6.5, 10.7 Hz, 6 H) **¹³C NMR** (75 MHz, D₂O) δ = 172.5, 171.2, 170.7, 169.9, 156.8, 155.2, 135.4, 130.8, 128.9, 128.5, 127.1, 125.4, 115.8, 55.1, 54.5, 42.4, 42.1, 42.0, 40.4, 37.0, 35.9, 24.0, 21.7, 20.7 **HRMS** (ESI⁺) m/z calcd for C₂₈H₃₇N₉O₅ (M + H)⁺ 602.2812 found 602.2809 Δ =0.3 mDa.

D-Leu(T)enkephalin (3).



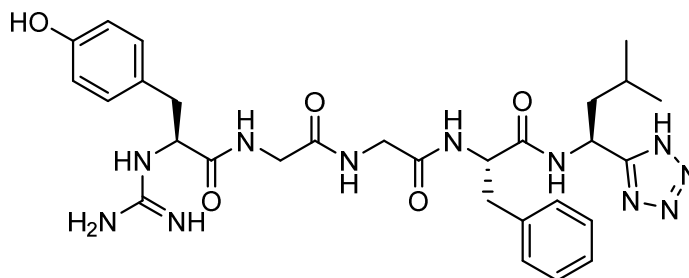
¹H NMR (300 MHz, D₂O) δ = 7.33 - 7.24 (m, 3 H), 7.21 - 7.13 (m, 2 H), 7.10 - 7.01 (m, 2 H), 6.82 - 6.73 (m, 2 H), 5.06 (dd, J = 6.5, 9.4 Hz, 1 H), 4.57 - 4.48 (m, 0 H), 4.24 - 4.12 (m, 1 H), 3.88 - 3.77 (m, 4 H), 3.10 - 2.87 (m, 4 H), 1.59 - 1.47 (m, 2 H), 1.02 - 0.90 (m, J = 7.3 Hz, 1 H), 0.71 (dd, J = 6.5, 14.0 Hz, 2 H) **¹³C NMR** (101 MHz, D₂O) δ = 173.1, 171.2, 170.7, 169.9, 157.7, 155.1, 135.7, 130.8, 129.1, 128.9, 127.3, 125.4, 115.8, 55.4, 54.5, 43.0, 42.3, 42.1, 40.7, 37.1, 35.9, 23.5, 21.9, 20.5 **HRMS** (ESI⁺) m/z calcd for C₂₈H₃₇N₉O₅ (M + Na)⁺ 602.2810 found 602.2819 Δ =0.9 mDa

GuaLeu (4).



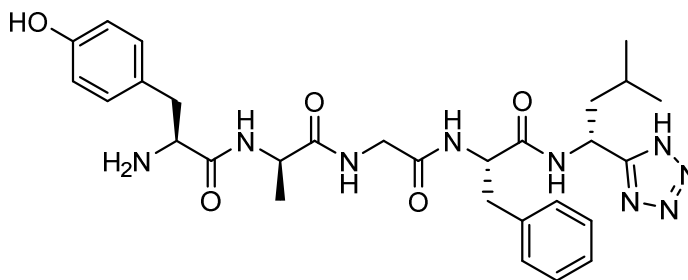
¹H NMR (400 MHz, D₂O) δ 7.23 - 7.40 (m, 5H), 7.12 - 7.19 (m, 2H), 6.81 - 6.89 (m, 2H), 4.60 - 4.67 (m, 1H), 4.41 - 4.48 (m, 1H), 4.30 - 4.37 (m, 1H), 3.82 - 3.97 (m, 4H), 3.10 - 3.23 (m, 2H), 2.93 - 3.05 (m, 2H), 1.50 - 1.68 (m, 3H), 0.87 (dd, *J* = 6.15, 19.13 Hz, 6H) **¹³C NMR** (101 MHz, D₂O) δ 176.2, 172.7, 172.2, 171.4, 170.8, 156.5, 154.7, 136.2, 130.7, 129.2, 128.7, 127.3, 127.1, 115.5, 56.5, 54.8, 51.6, 42.5, 42.2, 39.5, 37.2, 36.9, 24.3, 22.1, 20.6 **HRMS** (ESI) *m/z* calcd for C₂₉H₃₉N₇O₇ (M + H)⁺ 598.29837 found 598.3256 Δ=1.5 mDa

GuaLeu(T)Enkephalin (7).



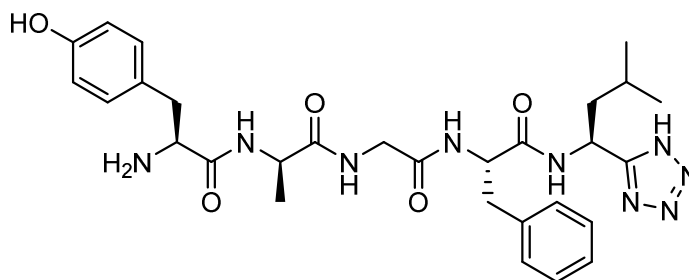
¹H NMR (400 MHz, D₂O) δ 7.09 - 7.18 (m, 5H), 6.98 - 7.07 (m, 2H), 6.83 (d, *J* = 8.54 Hz, 2H), 5.24 (dd, *J* = 6.32, 9.57 Hz, 1H), 4.50 (dd, *J* = 7.09, 8.80 Hz, 1H), 4.44 (dd, *J* = 5.55, 7.94 Hz, 1H), 3.95 (d, *J* = 3.76 Hz, 2H), 3.90 (s, 2H), 3.12 - 3.22 (m, 1H), 2.84 - 3.04 (m, 3H), 1.76 - 1.87 (m, 1H), 1.58 - 1.70 (m, 1H), 1.45 (ddd, *J* = 6.83, 12.47, 20.67 Hz, 1H), 0.86 (d, *J* = 6.66 Hz, 3H), 0.81 (d, *J* = 6.49 Hz, 3H) **¹³C NMR** (101MHz, D₂O) δ = 172.5, 172.2, 171.5, 170.8, 156.8, 156.5, 154.7, 135.4, 130.7, 128.9, 128.5, 127.2, 127.1, 115.5, 56.5, 55.1, 42.6, 42.2, 42.0, 40.3, 37.1, 36.9, 23.9, 21.7, 20.7 **HRMS** (ESI⁺) *m/z* calcd for C₂₉H₃₉N₁₁O₅ (M + H)⁺ 622.32084 found 622.3305 Δ=9.7 mDa

***D*-Ala-*D*-Leu(T)enkephalin (6).**



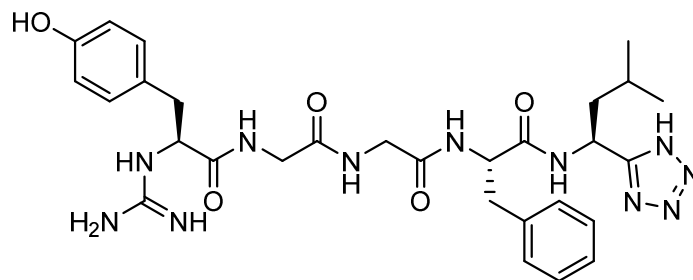
¹H NMR (300 MHz, D₂O) δ = 7.33 - 7.19 (m, 3 H), 7.18 - 7.11 (m, 2 H), 7.04 (s, 2 H), 6.80 (d, J = 8.6 Hz, 2 H), 5.11 - 4.96 (m, 1 H), 4.55 - 4.42 (m, 1 H), 4.15 - 4.00 (m, 2 H), 3.77 (s, 2 H), 3.16 - 2.84 (m, 4 H), 1.63 - 1.41 (m, 2 H), 1.07 (d, J = 7.3 Hz, 3 H), 1.03 - 0.86 (m, 1 H), 0.70 (dd, J = 6.6, 14.1 Hz, 6 H)
¹³C NMR (75 MHz, D₂O) δ = 174.9, 173.0, 170.8, 169.2, 157.6, 155.1, 135.7, 130.8, 129.1, 128.8, 127.3, 125.5, 118.2, 115.8, 55.3, 54.5, 49.8, 43.0, 42.1, 40.6, 37.1, 36.0, 23.5, 21.9, 20.5, 16.1 **HRMS** (ESI⁺) m/z calcd for C₂₉H₃₉N₉O₅ (M + H)⁺ 616.2966 found 616.2981 Δ =1.5 mDa

***D*-Ala-Leu(T)enkephalin (7).**



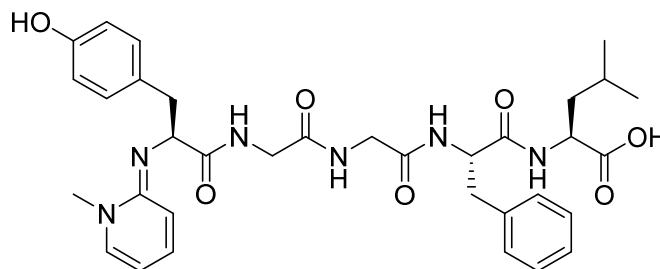
¹H NMR (300 MHz, D₂O) δ = 7.10 - 6.98 (m, 5 H), 6.94 (d, J = 1.8 Hz, 2 H), 6.80 (d, J = 8.8 Hz, 2 H), 5.21 - 5.08 (m, 1 H), 4.46 - 4.36 (m, 1 H), 4.13 - 4.01 (m, 2 H), 3.78 (s, 2 H), 3.16 - 2.77 (m, 4 H), 1.80 - 1.66 (m, 1 H), 1.56 (tt, J = 6.5, 14.5 Hz, 1 H), 1.34 (spt, J = 6.4 Hz, 1 H), 1.08 (d, J = 7.3 Hz, 3 H), 0.75 (dd, J = 6.6, 14.7 Hz, 6 H) **¹³C NMR** (75 MHz, D₂O) δ = 174.9, 172.3, 170.7, 169.2, 155.1, 135.4, 130.7, 128.9, 128.4, 127.0, 125.5, 115.8, 55.0, 54.5, 49.8, 42.3, 42.1, 40.7, 37.0, 36.0, 24.0, 21.6, 20.8, 16.1 **HRMS** (ESI⁺) m/z calcd for C₂₉H₃₉N₉O₅ (M + Na)⁺ 616.2966 found 616.2975 Δ =0.9 mDa.

Gua-D-Ala-Leu(T)Enkephalin (8).



¹H NMR (400 MHz, D₂O) δ 7.07 - 7.17 (m, 5H), 6.98 - 7.05 (m, 2H), 6.84 (ddd, J = 3.25, 4.27, 8.54 Hz, 1H), 5.23 (dd, J = 6.32, 9.57 Hz, 1H), 4.49 (dd, J = 7.69, 8.54 Hz, 1H), 4.40 (t, J = 6.75 Hz, 1H), 4.21 (dd, J = 7.17, 14.35 Hz, 1H), 3.86 (dd, J = 5.47, 17.42 Hz, 2H), 2.85 - 3.12 (m, 4H), 1.75 - 1.87 (m, 1H), 1.64 (ddd, J = 6.32, 7.00, 13.84 Hz, 1H), 1.45 (dddd, J = 6.49, 8.03, 14.52, 21.01 Hz, 1H), 1.28 (d, J = 7.34 Hz, 3H), 0.84 (dd, J = 6.58, 19.22 Hz, 6H) **¹³C NMR** (101 MHz, D₂O) δ 175.2, 172.4, 171.3, 170.8, 156.9, 156.2, 154.7, 135.5, 130.7, 128.9, 128.5, 127.0, 117.7, 115.5, 56.1, 55.0, 50.1, 42.2, 42.2, 42.0, 40.3, 37.4, 36.8, 23.9, 21.7, 20.6, 16.1 **HRMS** (ESI⁺) m/z calcd for C₃₀H₄₁N₁₁O₅ (M + H)⁺ 636.33649 found 636,3409 Δ =4.4 mDa.

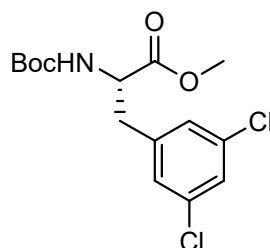
N-Methylpyridinium-Leu-Enképhaline (13).



Following the general procedure for solid phase peptide synthesis, Fmoc-Tyr(OtBu)-Gly-Gly-Phe-Leu was carried on resin. The terminal amine was then deprotected with a solution of 20 % Piperidine in DMF 2x5 min, and washed three times with DMF, three times with isopropanol and three times with DCM. After a positive Kaiser test, the resin was inserted into a solution of thiourea (3 eq) and N-methyl-2-chloropyridinium Iodine (3 eq) in DCM at RT. DIPEA (3 eq) was then added, and the reactor was shaken for 3 h at RT. The solution was then filtered out, and the resin was washed three times with DMF, three times with isopropanol and three times with DCM. The peptide was cleaved and purified in similar way as other peptides. **¹H NMR** (400 MHz, D₂O) δ = 7.97 - 7.85 (m, 2 H), 7.39 - 7.26 (m, 3 H), 7.26 - 7.20 (m, 2 H), 7.16 (td, J = 2.9, 8.7 Hz, 2 H), 7.00 - 6.91 (m, 2 H), 6.80 (td, J = 3.1, 8.7 Hz, 2 H), 4.73 (dd, J = 6.0, 8.4 Hz, 1 H), 4.60 (dd, J = 6.7, 8.2 Hz, 1 H), 4.37 - 4.28 (m, 1 H), 3.90 (s, 4 H), 3.80

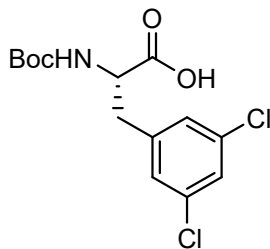
(s, 3 H), 3.38 - 3.29 (m, 1 H), 3.20 - 3.04 (m, 2 H), 2.96 (dd, $J = 8.2, 13.7$ Hz, 1 H), 1.67 - 1.48 (m, 3 H), 0.85 (dd, $J = 6.3, 21.0$ Hz, 6 H) ^{13}C NMR (101 MHz, D_2O) $\delta = 175.9, 172.7, 172.5, 171.4, 170.8, 154.7, 152.3, 143.9, 141.8, 136.1, 130.7, 129.2, 128.7, 127.5, 127.1, 115.6, 114.4, 111.3, 58.1, 54.8, 51.4, 42.6, 42.2, 41.8, 39.4, 36.9, 36.8, 24.2, 22.1, 20.5$ HRMS (ESI $^+$) m/z calcd for $\text{C}_{34}\text{H}_{42}\text{N}_6\text{O}_7$ ($\text{M} + \text{H}$) $^+$ 647.31932 found 647,3200 $\Delta=0.7$ mDa.

(S)-methyl-2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-3-(3,5-dichlorophenyl)propanoate (19).



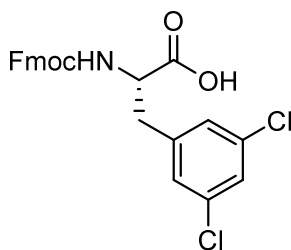
Zinc (252.3 mg; 3.86 mmol; 1.27 eq) and iodine (1.53 g; 0.012 mmol; 0.004 eq) were introduced into a 3-necked flask, charged with a condenser and under positive N_2 atmosphere at RT. The flask was then heated with a heatgun for 10 min, purged three times with nitrogen, and allowed to cool down to room temperature. Dry DMF (0.1 mL) was then added, followed by a solution of Boc-IodoAlanine-OMe (1 g; 3.04 mmol; 1 eq) in DMF (1.4 mL) dropwise under vigorous stirring. The reacting mixture was then stirred for 30 min at 0 $^\circ\text{C}$, or until total formation of the Zinc complex (monitored by TLC). After removal of the ice-bath, 3,5-DichloroIodoBenzene (0.78 g; 2.86 mmol; 0.91 eq), $\text{Pd}_2(\text{dba})_2$ (13.9 mg; 0.015 mmol; 0.005 eq), and SPhos (24.9 mg; 0.06 mmol; 0.02 eq) were added to the suspension. The reaction mixture is then stirred at 60 $^\circ\text{C}$ for 5h. This was then poured into 30 mL of Water, and 10 mL of 10 % citric acid was added. The aqueous layer was extracted with 2x15 mL of ethyl acetate, and the combined organic phases were washed with 2x10 mL of water and 10 mL of Brine, before being dried on MgSO_4 . This was finally filtrated on celite and evaporated under vacuum. The remaining residue was purified on silica with an hexane/ethyl acetate system gradient (0 % to 30 % ethyl acetate), to yield the title compound as a pale yellow oil (446 mg, 42 %). ^1H NMR (400 MHz, $\text{CDCl}_3\text{-d}$) δ 7.18 (t, $J = 1.88$ Hz, 1H), 6.95 (d, $J = 1.37$ Hz, 2H), 4.96 (d, $J = 6.83$ Hz, 1H), 4.48 (q, $J = 6.60$ Hz, 1H), 3.68 (s, 3H), 2.98 (ddd, $J = 5.64, 12.98, 43.04$ Hz, 2H), 1.27 - 1.44 (m, 9H) ^{13}C NMR (101 MHz, $\text{CDCl}_3\text{-d}$) δ 171.7, 154.8, 139.6, 134.9, 127.9, 127.3, 80.3, 54.1, 52.5, 37.8, 28.3 HRMS (ESI $^+$) m/z calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{19}\text{Cl}_2\text{NO}_4$ ($\text{M} + \text{H}$) $^+$ 348.0764 found 334.0678 $\Delta=13.5$ mDa.

(S)-2-((tert-butoxycarbonyl)amino)-3-(3,5-dichlorophenyl)propanoic acid (20).



To a solution of the dichloro (446.2 mg; 1.28 mmol; 1 eq) in THF/water (6/2 mL), was added LiOH (9.2 mg; 3.84 mmol; 3 eq) at room temperature. This was stirred at RT for 2h, and after completion THF was evaporated under vacuum and the residue was dissolved in Ethyl acetate (40 mL). The pH was adjusted to 3 with a solution of 1N HCl, and the organic layer was extracted with 2x10 mL of EtOAc. The organic layers were combined, dried over MgSO₄, and evaporated to dryness. The residue was then purified on silica with an hexane/ethyl acetate gradient (0% to 30 % ethyl acetate), to yield the title compound as a white solid (376 mg, 88 %). ¹H NMR (400 MHz , MeOD-d₄) δ = 7.27 (s, 1 H), 7.21 (d, *J* = 1.7 Hz, 2 H), 4.35 (dd, *J* = 4.8, 9.6 Hz, 1 H), 3.18 (dd, *J* = 4.8, 13.8 Hz, 1 H), 2.88 (dd, *J* = 9.7, 13.8 Hz, 1 H), 1.38 (s, 9 H) ¹³C NMR (101 MHz ,MeOD-d₄) δ = 173.2, 156.3, 141.5, 134.4, 127.8, 126.3, 79.3, 54.4, 36.7, 27.3 HRMS (ESI⁺) *m/z* calcd for C₁₄H₁₇Cl₂NO₄ (M + H)⁺ 334.06074 found 334.0678 Δ=0.4 mDa.

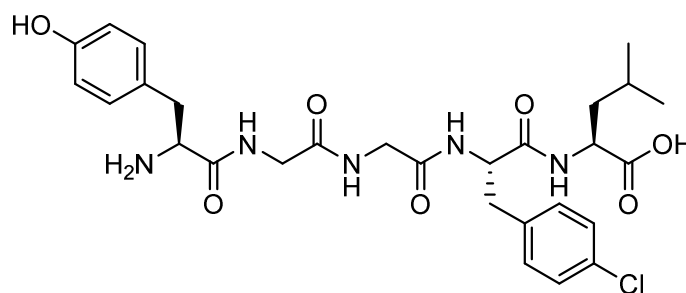
(S)-2-(((9H-fluoren-9-yl)methoxy)carbonyl)amino)-3-(3,5-dichlorophenyl)propanoic acid (21).



Solid **20** (0,3 g; 1,28 mmol; 1 eq) from the previous step was added to 4M HCl in dioxane (10 mL) and the solution was stirred 2h at RT. After complete Boc deprotection, the solvent was evaporated under vacuum. The remaining residue was redissolved in Dioxane/water (5/5 mL), and Na₂CO₃ (339,2 mg; 3,2 mmol; 2,5 eq) was added at RT while stirring. The reaction mixture was cooled down to 0 °C, and a solution of Fmoc chloride (298 mg; 1,15 mmol; 0,9 eq) in Dioxane (5 mL) was added dropwise for 30 min. After addition, this was brought to RT and allowed to react at RT overnight. The reaction completed, dioxane was removed by evaporation and dissolved in Ethyl acetate. The aqueous layer pH was acidified to 4, and the precipitate was extracted with 3x30 mL of EtOAc. The combined organic

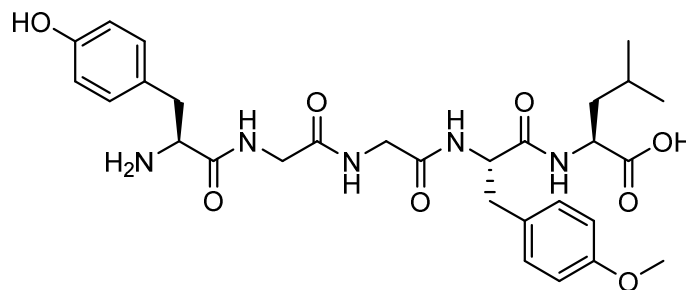
layers were washed with 20 mL Brine and dried on MgSO_4 , and evaporated under vacuum. The pale-yellow solid was purified on silica, using a DCM/Methanol gradient system (0 % to 10% methanol), yielding the title compound as a white solid (346 mg, 59 %). **^1H NMR** (400 MHz, MeOD-d_4) δ = 7.78 (d, J = 7.5 Hz, 2 H), 7.59 (t, J = 7.1 Hz, 2 H), 7.38 (t, J = 7.5 Hz, 3 H), 7.33 - 7.22 (m, 5 H), 4.47 - 4.39 (m, 1 H), 4.38 - 4.31 (m, 1 H), 4.27 - 4.14 (m, 2 H), 3.22 (dd, J = 4.4, 14.1 Hz, 1 H), 2.93 (dd, J = 9.7, 13.8 Hz, 1 H) **^{13}C NMR** (101 MHz, $\text{CDCl}_3\text{-d}$) δ = 172.0, 155.6, 143.4, 141.1, 138.9, 134.9, 127.7, 127.6, 127.4, 127.0, 124.9, 119.9, 67.1, 60.4, 46.9, 37.2 **HRMS** (ESI^+) m/z calcd for $\text{C}_{24}\text{H}_{19}\text{Cl}_2\text{NO}_4$ ($\text{M} + \text{H}$)⁺ 456.0764 found 456.0882 Δ =11.8 mDa.

H-Tyr-Gly-Gly-Phe(4-Cl)-Leu-OH (22).



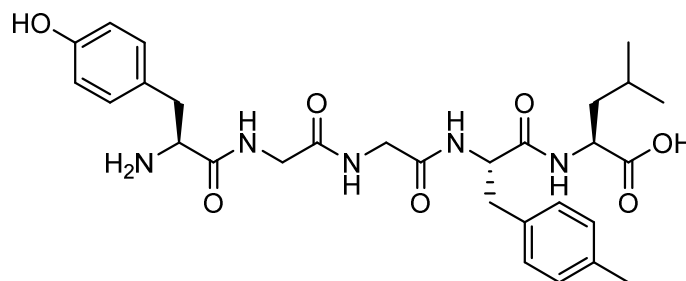
^1H NMR (400 MHz, D_2O) δ 7.26 (td, J = 1.88, 8.37 Hz, 2H), 7.10 (tdd, J = 1.88, 8.37, 18.79 Hz, 4H), 6.79 (td, J = 1.90, 8.54 Hz, 2H), 4.53 (t, J = 7.00 Hz, 1H), 4.25 (dd, J = 5.81, 8.88 Hz, 1H), 4.16 (t, J = 7.26 Hz, 1H), 3.79 (dd, J = 5.47, 20.16 Hz, 4H), 3.06 (d, J = 7.34 Hz, 2H), 2.96 (ddd, J = 7.09, 13.92, 23.23 Hz, 2H), 1.40 - 1.58 (m, 3H), 0.78 (dd, J = 6.32, 21.01 Hz, 6H) **^{13}C NMR** (101 MHz, D_2O) δ = 175.8, 172.6, 171.1, 170.6, 169.9, 155.2, 134.7, 132.3, 130.8, 130.7, 128.5, 125.4, 115.9, 54.5, 51.4, 42.4, 42.1, 39.4, 36.4, 35.9, 24.2, 22.1, 20.6 **HRMS** (ESI^+) m/z calcd for $\text{C}_{28}\text{H}_{36}\text{ClN}_5\text{O}_7$ ($\text{M} + \text{Na}$)⁺ 612.2195 found 612.2193 Δ =0.2 mDa.

H-Tyr-Gly-Gly-Phe(4-OMe)-Leu-OH (23).



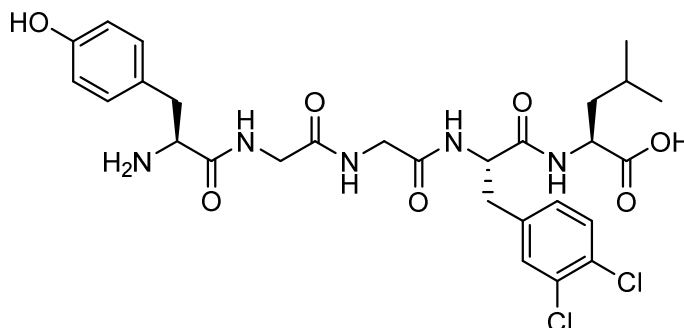
¹H NMR (400 MHz, D₂O) δ 7.08 (ttt, J = 2.22, 2.90, 8.71 Hz, 4H), 6.84 (td, J = 2.22, 8.88 Hz, 2H), 6.78 (td, J = 2.22, 8.71 Hz, 2H), 4.50 (t, J = 7.50 Hz, 1H), 4.24 (dd, J = 2.90, 5.98 Hz, 1H), 4.15 (t, J = 7.34 Hz, 1H), 3.79 (dd, J = 4.44, 12.30 Hz, 4H), 3.70 (s, 3H), 3.04 (d, J = 7.17 Hz, 2H), 2.91 (ddd, J = 6.32, 7.00, 20.50 Hz, 2H), 1.36 - 1.58 (m, 3H), 0.76 (dd, J = 6.41, 19.39 Hz, 11H) **¹³C NMR** (101 MHz, D₂O) δ 175.8, 172.8, 171.1, 170.6, 169.9, 157.8, 155.2, 130.8, 130.4, 128.6, 125.4, 115.8, 114.1, 55.3, 54.8, 54.5, 51.3, 42.4, 42.1, 39.4, 36.2, 35.9, 24.2, 22.1, 20.5 **HRMS** (ESI⁺) m/z calcd for C₂₉H₃₉N₅O₈ (M + Na)⁺ 608.2691 found 608.2701 Δ =1.0 mDa

H-Tyr-Gly-Gly-Phe(4-Me)-Leu-OH (24).



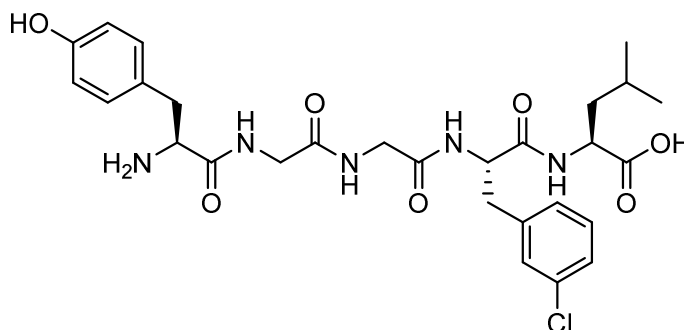
¹H NMR (400 MHz, MeOD-d₄) δ 7.16 (d, J = 8.37 Hz, 2H), 7.04 - 7.13 (m, 4H), 6.78 (td, J = 1.54, 8.20 Hz, 2H), 4.67 (dd, J = 4.70, 9.65 Hz, 1H), 4.35 - 4.45 (m, 1H), 4.08 (dd, J = 6.32, 8.20 Hz, 1H), 3.67 - 4.00 (m, 4H), 3.14 (dt, J = 5.55, 13.71 Hz, 2H), 2.86 - 3.03 (m, 2H), 2.28 (s, 3H), 1.58 - 1.76 (m, 3H), 0.92 (dd, J = 6.32, 19.30 Hz, 6H) **¹³C NMR** (101 MHz, MeOD-d₄) δ 174.3, 172.4, 170.1, 169.7, 169.6, 157.0, 135.9, 133.8, 130.1, 128.9, 128.7, 124.6, 115.5, 54.8, 54.3, 50.8, 42.5, 41.7, 40.0, 37.2, 36.2, 24.5, 21.9, 20.4, 19.7 **HRMS** (ESI⁺) m/z calcd for C₂₉H₃₉N₅O₇ (M + H)⁺ 570.2922 found 570.2953 Δ =3.1 mDa

H-Tyr-Gly-Gly-Phe(3,4-Cl₂)-Leu-OH (25).



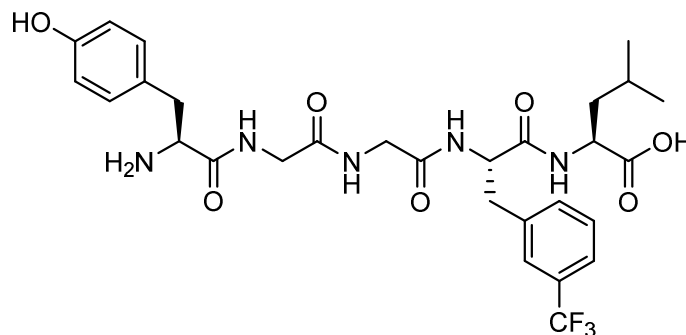
¹H NMR (400 MHz, D₂O) δ 7.35 (d, J = 8.37 Hz, 1H), 7.28 (d, J = 2.05 Hz, 1H), 7.00 - 7.10 (m, 3H), 6.78 (td, J = 2.20, 8.71 Hz, 3H), 4.53 (t, J = 7.52 Hz, 2H), 4.24 (dd, J = 6.15, 8.71 Hz, 2H), 4.16 (t, J = 6.50 Hz, 1H), 3.80 (dd, J = 3.93, 16.23 Hz, 4H), 3.05 (d, J = 7.17 Hz, 2H), 2.85 - 3.02 (m, J = 6.80, 13.50, 13.50 Hz, 2H), 1.37 - 1.56 (m, 3H), 0.77 (dd, J = 6.49, 20.50 Hz, 13H) **¹³C NMR** (101 MHz, D₂O) δ 175.7, 172.2, 171.1, 170.6, 169.9, 155.2, 136.6, 131.6, 131.0, 130.8, 130.4, 130.3, 129.0, 125.4, 115.8, 54.5, 54.3, 51.3, 42.4, 42.1, 39.4, 36.2, 35.9, 24.2, 22.1, 20.5 **HRMS** (ESI⁺) m/z calcd for C₂₈H₃₅Cl₂N₅O₇ (M + Na)⁺ 646.1806 found 646.1803 Δ =0.3 mDa

H-Tyr-Gly-Gly-Phe(3-Cl)-Leu-OH (26).



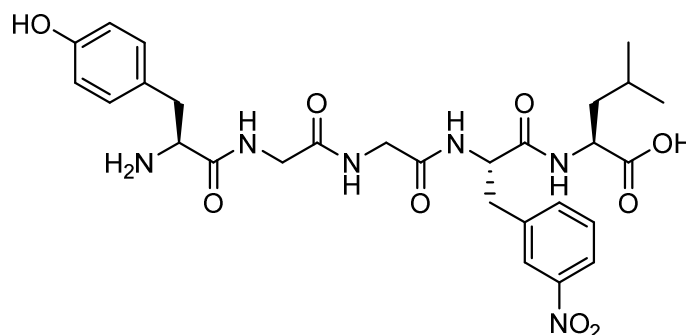
¹H NMR (400 MHz, D₂O) δ 7.18 - 7.21 (m, 2H), 7.16 (d, J = 1.03 Hz, 1H), 7.03 - 7.09 (m, 3H), 6.78 (td, J = 2.22, 8.71 Hz, 3H), 4.53 (t, J = 7.52 Hz, 1H), 4.22 - 4.28 (m, 1H), 4.16 (dd, J = 7.30, 7.34 Hz, 1H), 3.79 (dd, J = 8.03, 12.30 Hz, 4H), 3.04 (d, J = 7.17 Hz, 2H), 2.94 (dddd, J = 7.34, 13.15, 17.76, 19.98 Hz, 3H), 1.39 - 1.57 (m, 3H), 0.77 (dd, J = 6.15, 13.66 Hz, 3H) **¹³C NMR** (101 MHz, D₂O) δ 175.7, 172.4, 171.1, 170.6, 169.9, 155.2, 138.2, 133.6, 130.8, 130.1, 129.1, 127.6, 127.1, 125.4, 115.9, 54.5, 51.3, 42.4, 42.1, 39.4, 36.7, 35.9, 24.2, 22.1, 20.6 **HRMS** (ESI⁺) m/z calcd for C₂₈H₃₆ClN₅O₇ (M + Na)⁺ 612.2195 found 612.2194 Δ =0.1 mDa

H-Tyr-Gly-Gly-Phe(3-CF₃)-Leu-OH (27).



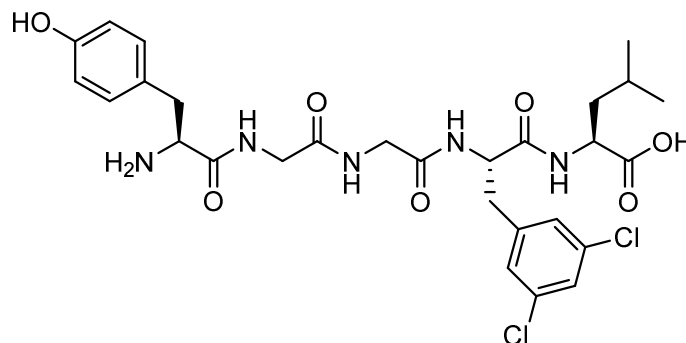
¹H NMR (400 MHz, D₂O) δ 7.49 - 7.54 (m, 1H), 7.48 (br. s, 1H), 7.36 - 7.45 (m, 2H), 7.07 (td, J = 2.05, 8.37 Hz, 2H), 6.78 (td, J = 2.05, 8.71 Hz, 2H), 4.57 (t, J = 7.70 Hz, 1H), 4.20 - 4.28 (m, 1H), 4.16 (t, J = 7.00 Hz, 1H), 3.79 (ddd, J = 2.05, 5.47, 8.54 Hz, 5H), 2.95 - 3.14 (m, 5H), 1.40 - 1.56 (m, 3H), 0.76 (dd, J = 6.06, 19.56 Hz, 9H) **¹³C NMR** (101 MHz, D₂O) δ 175.8, 172.2, 171.1, 170.6, 169.9, 155.2, 137.0, 132.9, 130.8, 130.2, 129.2, 125.8, 125.4, 123.9, 115.8, 54.5, 54.5, 51.3, 42.4, 42.0, 39.5, 36.8, 35.9, 24.2, 22.1, 20.6 **HRMS** (ESI⁺) m/z calcd for C₂₈H₃₇F₃N₅O₇ (M + Na)⁺ 646.1806 found 646.1803 Δ =0.3 mDa

H-Tyr-Gly-Gly-Phe(3-NO₂)-Leu-OH (28).



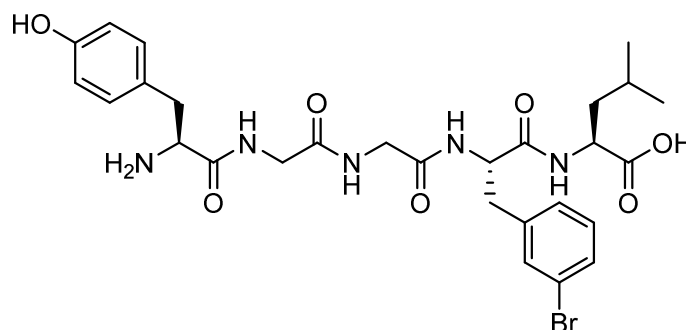
¹H NMR (400 MHz, D₂O) δ 8.04 (qd, J = 1.02, 8.20 Hz, 1H), 8.01 (t, J = 1.71 Hz, 1H), 7.57 (td, J = 1.22, 7.99 Hz, 1H), 7.46 (t, J = 7.90 Hz, 1H), 7.07 (td, J = 2.90, 8.71 Hz, 2H), 6.78 (td, J = 2.90, 8.54 Hz, 2H), 4.61 (dd, J = 7.00, 8.03 Hz, 1H), 4.22 - 4.29 (m, 1H), 4.16 (t, J = 7.52 Hz, 1H), 3.70 - 3.88 (m, 4H), 3.01 - 3.19 (m, 4H), 1.41 - 1.56 (m, 3H), 0.77 (dd, J = 6.15, 19.64 Hz, 6H) **¹³C NMR** (101 MHz, D₂O) δ 175.8, 172.1, 171.1, 170.7, 169.9, 155.2, 147.7, 138.0, 136.1, 130.8, 129.7, 125.4, 124.1, 122.2, 115.8, 54.5, 54.3, 51.1, 42.4, 42.1, 39.4, 36.6, 35.9, 24.2, 22.1, 20.3 **HRMS** (ESI⁺) m/z calcd for C₂₈H₃₇N₆O₉ (M + Na)⁺ 623.2441 found 623.2447 Δ =0.6 mDa

H-Tyr-Gly-Gly-Phe(3,5-Cl₂)-Leu-OH (29).



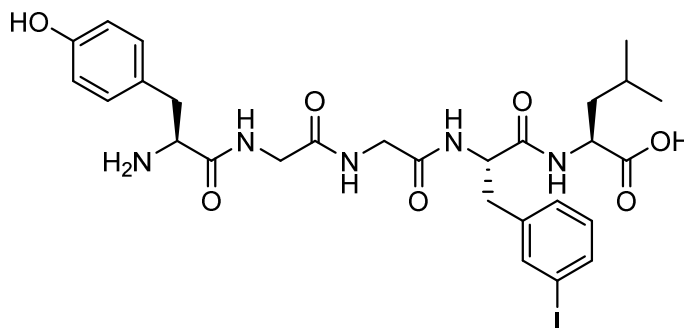
¹H NMR (400 MHz, MeOD-d₄) δ 7.31 (d, *J* = 1.88 Hz, 2H), 7.27 - 7.29 (m, 1H), 7.11 (td, *J* = 3.10, 8.37 Hz, 2H), 6.78 (td, *J* = 2.00, 8.71 Hz, 2H), 4.71 (dd, *J* = 4.87, 9.48 Hz, 1H), 4.40 (dd, *J* = 6.92, 7.94 Hz, 1H), 4.09 (dd, *J* = 6.58, 8.11 Hz, 1H), 3.95 (dd, *J* = 11.96, 16.74 Hz, 2H), 3.76 (dd, *J* = 13.15, 16.74 Hz, 2H), 3.16 (dd, *J* = 5.98, 13.84 Hz, 2H), 2.97 (td, *J* = 8.00, 13.84 Hz, 2H), 1.58 - 1.77 (m, 3H), 0.93 (dd, *J* = 6.15, 19.98 Hz, 6H) **¹³C NMR** (101 MHz, MeOD-d₄) δ 174.2, 171.7, 170.0, 169.9, 169.7, 156.9, 141.0, 134.5, 130.2, 127.8, 126.5, 124.6, 115.5, 54.8, 53.8, 50.8, 42.6, 41.8, 40.1, 36.9, 36.3, 24.6, 22.0, 20.4 **HRMS** (ESI⁺) *m/z* calcd for C₂₈H₃₅Cl₂N₅O₇ (M + H)⁺ 624.1986 found 624.1987 Δ=0.1 mDa

H-Tyr-Gly-Gly-Phe(3-Br)-Leu-OH (30).



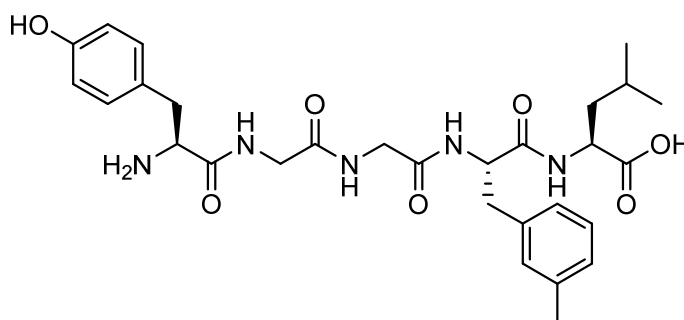
¹H NMR (400 MHz, MeOD-d₄) δ 7.67 (s, 1H), 7.47 (dd, *J* = 7.86, 35.70 Hz, 2H), 7.31 - 7.39 (m, 1H), 7.28 (d, *J* = 8.37 Hz, 2H), 6.95 (d, *J* = 8.37 Hz, 2H), 4.88 (dd, *J* = 4.70, 9.65 Hz, 1H), 4.49 - 4.65 (m, 1H), 4.30 (t, *J* = 7.34 Hz, 1H), 4.12 (dd, *J* = 12.21, 16.65 Hz, 2H), 3.91 (dd, *J* = 17.08, 20.16 Hz, 2H), 3.25 - 3.39 (m, 2H), 3.05 - 3.24 (m, 2H), 1.72 - 1.94 (m, 3H), 1.08 (dd, *J* = 6.06, 18.87 Hz, 6H) **¹³C NMR** (101 MHz, MeOD-d₄) δ 174.3, 172.0, 170.1, 169.9, 169.9, 156.9, 139.6, 132.1, 130.2, 129.8, 129.5, 128.0, 124.6, 122.0, 115.5, 54.8, 54.1, 50.9, 42.7, 41.9, 40.1, 37.2, 36.3, 24.6, 22.0, 20.5 **HRMS** (ESI⁺) *m/z* calcd for C₂₈H₃₆BrN₅O₇ (M + H)⁺ 634.1871 found 634.1856 Δ=1.5 mDa

H-Tyr-Gly-Gly-Phe(3-I)-Leu-OH (31).



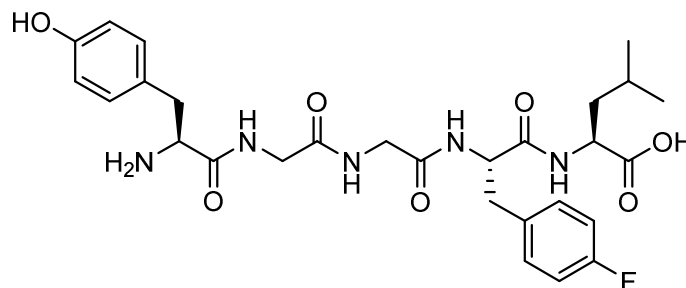
¹H NMR (400 MHz, MeOD-*d*₄) δ 7.72 (t, *J* = 1.62 Hz, 1H), 7.56 (ddd, *J* = 1.02, 1.71, 7.86 Hz, 1H), 7.29 (qd, *J* = 1.02, 7.69 Hz, 1H), 7.11 (ddd, *J* = 2.05, 2.73, 8.71 Hz, 2H), 7.05 (t, *J* = 7.77 Hz, 1H), 6.79 (ddd, *J* = 2.05, 2.90, 8.71 Hz, 2H), 4.69 (dd, *J* = 4.70, 9.82 Hz, 1H), 4.40 (dd, *J* = 6.83, 7.86 Hz, 1H), 4.10 (dd, *J* = 6.49, 8.03 Hz, 1H), 3.95 (dd, *J* = 16.65, 18.70 Hz, 2H), 3.75 (dd, *J* = 16.65, 19.39 Hz, 2H), 3.06 - 3.23 (m, 2H), 2.86 - 3.04 (m, 2H), 1.56 - 1.77 (m, 3H), 0.93 (dd, *J* = 6.32, 19.81 Hz, 6H) **¹³C NMR** (101 MHz, MeOD-*d*₄) δ 174.3, 172.0, 170.0, 169.8, 169.8, 156.9, 139.6, 138.1, 135.6, 130.2, 129.9, 128.5, 124.6, 115.5, 93.6, 54.8, 54.1, 50.8, 42.7, 41.7, 40.0, 37.0, 36.2, 24.6, 22.0, 20.4 **HRMS** (ESI⁺) *m/z* calcd for C₂₈H₃₆IN₅O₇ (M + H)⁺ 682.1732 found 682.1711 Δ=2.1 mDa

H-Tyr-Gly-Gly-Phe(3-Me)-Leu-OH (32).



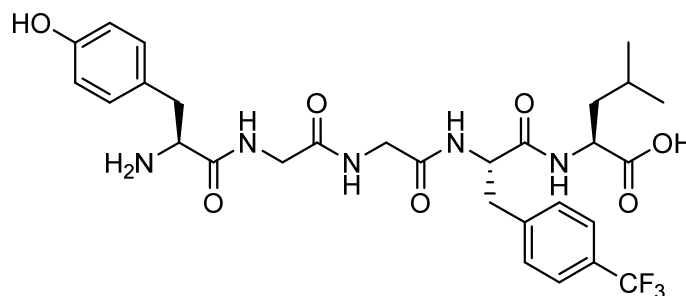
¹H NMR (400 MHz, MeOD-*d*₄) δ 7.09 - 7.17 (m, 4H), 7.03 (dd, *J* = 7.34, 21.18 Hz, 2H), 6.78 (td, *J* = 2.56, 8.54 Hz, 2H), 4.68 (dd, *J* = 4.95, 9.57 Hz, 1H), 4.37 - 4.45 (m, 1H), 4.10 (dd, *J* = 6.49, 8.37 Hz, 1H), 3.94 (dd, *J* = 12.30, 16.74 Hz, 2H), 3.75 (dd, *J* = 16.23, 23.23 Hz, 2H), 3.09 - 3.20 (m, 2H), 2.88 - 3.03 (m, 2H), 2.31 (s, 3H), 1.59 - 1.75 (m, 3H), 0.92 (dd, *J* = 6.23, 19.05 Hz, 6H) **¹³C NMR** (101 MHz, MeOD-*d*₄) δ 174.2, 172.4, 170.0, 169.7, 156.9, 137.7, 136.8, 130.2, 129.7, 127.9, 127.1, 126.0, 124.6, 115.5, 54.8, 54.4, 50.8, 42.6, 41.8, 40.1, 37.5, 36.3, 24.5, 22.0, 20.5, 20.1 **HRMS** (ESI⁺) *m/z* calcd for C₂₉H₃₉N₅O₇ (M + H)⁺ 570.2922 found 570.2953 Δ=1.8 mDa

H-Tyr-Gly-Gly-Phe(4-F)-Leu-OH (33).



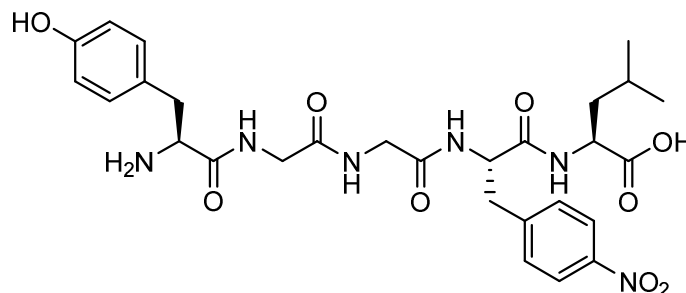
¹H NMR (400 MHz, MeOD-*d*₄) δ 7.11 (td, *J* = 2.70, 8.50 Hz, 2H), 6.99 (tt, *J* = 2.22, 8.71 Hz, 1H), 6.79 (td, *J* = 2.22, 8.71 Hz, 2H), 4.63 - 4.73 (m, 1H), 4.36 - 4.45 (m, 1H), 4.09 (dd, *J* = 6.49, 8.20 Hz, 1H), 3.94 (dd, *J* = 18.11, 19.47 Hz, 2H), 3.76 (dd, *J* = 16.91, 25.96 Hz, 2H), 3.12 - 3.21 (m, 2H), 2.91 - 3.02 (m, 2H), 1.59 - 1.75 (m, 3H), 0.92 (dd, *J* = 6.32, 19.98 Hz, 6H) **¹³C NMR** (101 MHz, MeOD-*d*₄) δ 174.2, 172.1, 170.1, 169.7, 169.7, 163.1, 160.7, 156.9, 132.8, 130.8, 130.8, 130.1, 124.6, 115.5, 114.7, 114.5, 54.8, 54.2, 50.8, 42.6, 41.7, 40.1, 36.7, 36.3, 24.6, 21.9, 20.4 **HRMS** (ESI⁺) *m/z* calcd for C₂₈H₃₆FN₅O₇ (M + H)⁺ 574.2671 found 574.2686 Δ=1.4 mDa

H-Tyr-Gly-Gly-Phe(4-CF₃)-Leu-OH (34).



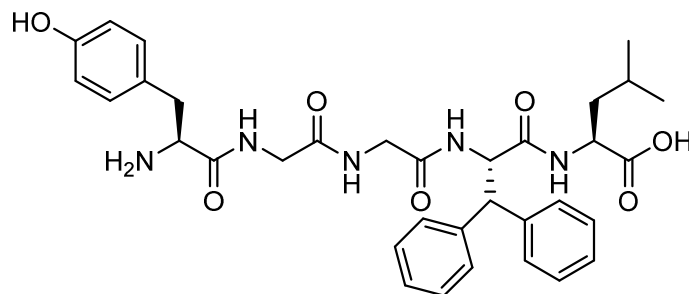
¹H NMR (400 MHz, MeOD-*d*₄) δ 7.58 (d, *J* = 8.37 Hz, 2H), 7.48 (d, *J* = 8.03 Hz, 2H), 7.11 (td, *J* = 2.05, 7.86 Hz, 2H), 6.79 (td, *J* = 1.88, 8.54 Hz, 2H), 4.76 (dd, *J* = 4.70, 9.65 Hz, 1H), 4.40 (t, *J* = 7.34 Hz, 1H), 4.09 (dd, *J* = 6.32, 8.20 Hz, 1H), 3.68 - 4.01 (m, 4H), 2.91 - 3.30 (m, 4H), 1.60 - 1.75 (m, 3H), 0.93 (dd, *J* = 6.32, 19.64 Hz, 6H) **¹³C NMR** (101 MHz, MeOD-*d*₄) δ 174.2, 171.9, 170.2, 169.7, 156.9, 141.6, 130.2, 129.7, 124.9, 124.5, 115.5, 54.8, 53.8, 50.9, 42.6, 41.7, 40.0, 37.3, 36.2, 24.5, 21.9, 20.3 **HRMS** (ESI⁺) *m/z* calcd for C₂₈H₃₇F₃N₅O₇ (M + H)⁺ 624.2639 found 624.2679 Δ=3.9 mDa

H-Tyr-Gly-Gly-Phe(4-NO₂)-Leu-OH (35).



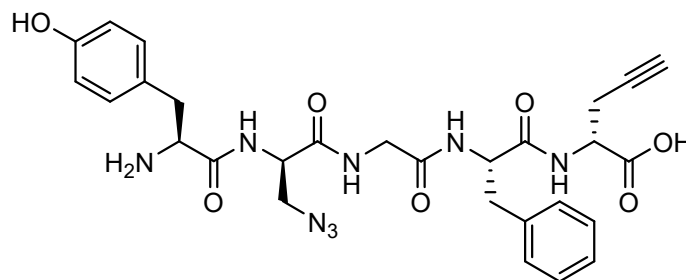
¹H NMR (400 MHz, MeOD-d₄) δ 8.15 (td, *J* = 1.88, 8.71 Hz, 2H), 7.52 (td, *J* = 2.05, 8.71 Hz, 2H), 7.11 (td, *J* = 2.56, 8.54 Hz, 2H), 6.79 (td, *J* = 2.05, 8.54 Hz, 2H), 4.78 (dd, *J* = 4.95, 9.39 Hz, 1H), 4.35 - 4.45 (m, 1H), 4.10 (dd, *J* = 6.32, 8.20 Hz, 1H), 3.69 - 4.01 (m, *J* = 15.70, 17.10, 74.00 Hz, 4H), 3.07 - 3.20 (m, 2H), 2.98 (dd, *J* = 8.20, 14.18 Hz, 1H), 1.58 - 1.76 (m, 3H), 0.93 (dd, *J* = 6.15, 19.64 Hz, 6H) **¹³C NMR** (101 MHz, MeOD-d₄) δ 174.2, 171.6, 170.1, 169.8, 169.7, 157.0, 147.0, 144.9, 130.3, 130.1, 124.6, 123.0, 115.5, 54.8, 53.5, 50.8, 42.6, 41.8, 40.0, 37.4, 36.2, 24.5, 21.9, 20.3 **HRMS** (ESI⁺) *m/z* calcd for C₂₈H₃₇N₆O₉ (M + H)⁺ 601.2616 found 601.2681 Δ=6.5 mDa

H-Tyr-Gly-Gly-Phe(β-Phe)-Leu-OH (36).



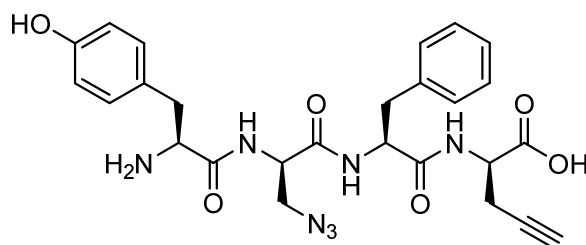
¹H NMR (400 MHz, MeOD-d₄) δ = 7.37 - 7.30 (m, 4 H), 7.29 - 7.19 (m, 4 H), 7.19 - 7.10 (m, 4 H), 6.80 (td, *J* = 2.9, 8.7 Hz, 2 H), 5.35 (d, *J* = 11.3 Hz, 1 H), 4.52 (d, *J* = 11.4 Hz, 1 H), 4.18 (t, *J* = 7.3 Hz, 1 H), 4.11 (dd, *J* = 6.4, 8.3 Hz, 1 H), 3.89 (d, *J* = 16.2 Hz, 1 H), 3.78 - 3.63 (m, 3 H), 3.20 (dd, *J* = 6.3, 14.2 Hz, 1 H), 3.02 (dd, *J* = 8.2, 14.2 Hz, 1 H), 1.57 - 1.43 (m, 3 H), 0.84 (dd, *J* = 6.3, 14.9 Hz, 6 H) **¹³C NMR** (101 MHz, MeOD-d₄) δ = 173.5, 170.8, 170.1, 169.8, 169.4, 156.9, 140.9, 140.4, 130.2, 128.2, 128.1, 128.1, 128.0, 126.5, 124.6, 115.5, 55.9, 54.7, 52.8, 50.8, 42.7, 41.7, 40.4, 36.3, 24.3, 21.8, 20.73 **HRMS** (ESI⁺) *m/z* calcd for C₂₈H₃₇N₆O₉ (M + H)⁺ 632.3079 found 632.3092 Δ=1.3 mDa

H-Tyr-D-Dap(N₃)-Gly-Phe-D-Pra-OH (40).



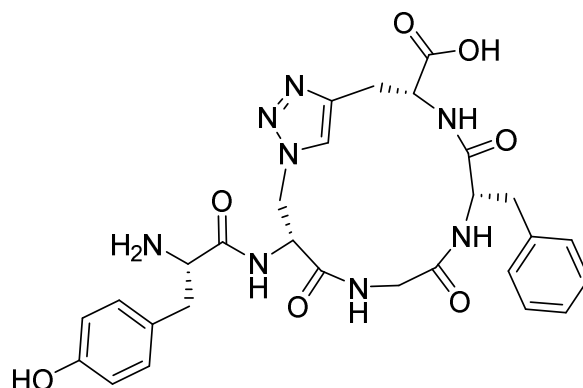
¹H NMR (400 MHz, D₂O) δ = 7.41 - 7.35 (m, 2 H), 7.35 - 7.30 (m, 1 H), 7.30 - 7.25 (m, 2 H), 7.18 (td, J = 2.2, 8.7 Hz, 1 H), 6.92 (td, J = 1.9, 8.7 Hz, 1 H), 4.75 - 4.68 (m, J = 2.0 Hz, 1 H), 4.43 (q, J = 6.7 Hz, 2 H), 4.25 (dd, J = 6.5, 8.7 Hz, 1 H), 3.87 (d, J = 3.8 Hz, 1 H), 3.61 (dd, J = 6.0, 13.0 Hz, 1 H), 3.37 (dd, J = 4.8, 13.0 Hz, 1 H), 3.27 - 3.13 (m, 2 H), 3.12 - 2.97 (m, 2 H), 2.70 - 2.52 (m, 2 H), 2.37 (t, J = 2.4 Hz, 1 H). **¹³C NMR** (101 MHz, D₂O) δ = 175.5, 172.6, 172.2, 172.0, 169.2, 155.2, 136.4, 130.9, 129.2, 128.8, 127.3, 125.5, 116.0, 80.0, 71.7, 56.7, 54.9, 54.3, 52.8, 52.7, 42.7, 37.5, 35.8, 21.5 **HRMS** (ESI⁺) m/z calcd for C₂₈H₃₂N₈O₇ (M + H)⁺ 593.2467 found 593.2467 Δ =0 mDa **IR** 2112 cm⁻¹ (C-N₃)

H-Tyr-D-Dap(N₃)-Gly-D-Pra-OH (43).



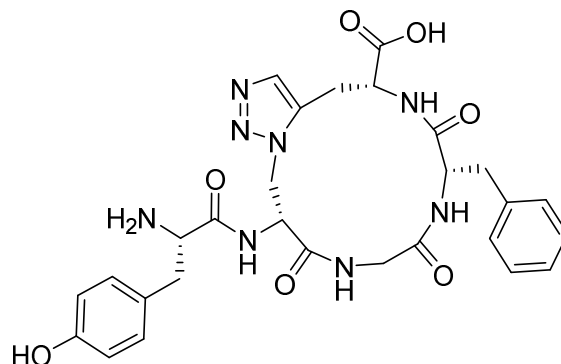
¹H NMR (300 MHz, D₂O) δ = 7.41 - 7.16 (m, 5 H), 7.08 (d, J = 8.6 Hz, 1 H), 6.82 (d, J = 8.6 Hz, 1 H), 4.65 - 4.64 (m, 1 H), 4.35 (q, J = 5.7 Hz, 1 H), 4.12 (dd, J = 6.8, 8.6 Hz, 1 H), 3.31 - 3.05 (m, 4 H), 3.04 - 2.81 (m, 2 H), 2.64 - 2.45 (m, 2 H), 2.31 (t, J = 2.6 Hz, 1 H) **HRMS** (ESI⁺) m/z calcd for C₂₆H₂₉N₇O₆ (M + H)⁺ 536.2252 found 536.2408 Δ =15.6 mDa **IR** 2110 cm⁻¹ (C-N₃)

H-Tyr-c[D-Dab(N₃)-Gly-Phe-D-Pra]-OH (1,4-triazole) (41).



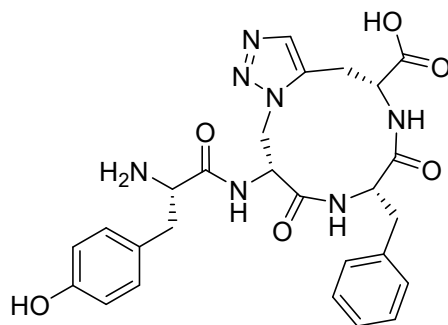
Resin was placed in the reaction vessel and was swelled into DCM for 30 min. Meanwhile, a solution was degassed with nitrogen for 30 min. After discarding the solvent, CuBr (1 eq) dissolved in 1 mL of DMSO was added to the resin, followed by sodium ascorbate (1 eq) dissolved in 1 mL of water, 1,6-lutidine (10 eq) and DIPEA (10 eq). The reacting mixture was bubbled with nitrogen for 15 more minutes, and the reactor was shaken at room temperature overnight or until completion of the reaction. Finally, the resin was washed thoroughly with DMSO (3 times), followed by DMF (3 times), then with methanol and DCM alternatively. Peptide was cleaved following classical TFA cleavage method described in general solid phase peptide synthesis. **¹H NMR** (400 MHz, D₂O) δ = 7.39 (br. s, 1 H), 7.33 - 7.27 (m, 2 H), 7.27 - 7.20 (m, 3 H), 7.16 (td, J = 2.7, 8.5 Hz, 1 H), 6.83 (td, J = 2.2, 8.7 Hz, 1 H), 4.83 (t, J = 3.3 Hz, 1 H), 4.55 (dd, J = 3.4, 15.0 Hz, 1 H), 4.42 (dd, J = 5.4, 9.5 Hz, 1 H), 4.21 (dt, J = 1.2, 7.9 Hz, 1 H), 3.88 (d, J = 15.4 Hz, 1 H), 3.51 (d, J = 15.4 Hz, 1 H), 3.31 - 3.17 (m, 2 H), 3.17 - 3.11 (m, 2 H), 3.11 - 2.86 (m, 2 H) **¹³C NMR** (101 MHz, D₂O) δ = 175.5, 172.6, 172.2, 172.0, 169.0, 155.2, 136.2, 130.9, 129.2, 128.9, 128.8, 127.3, 125.5, 120.7, 116.0, 56.7, 54.9, 54.3, 52.8, 52.7, 42.7, 37.5, 36.4, 35.8 **HRMS** (ESI⁺) m/z calcd for C₂₈H₃₂N₈O₇ (M + H)⁺ 593.2467 found 593.2470 Δ =0.3 mDa

H-Tyr-c[D-Dab(N₃)-Gly-Phe-D-Pra]-OH (1,5-triazole) (42).



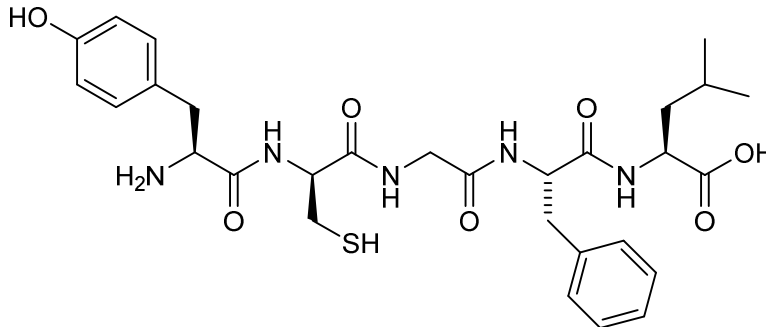
Dry DMF was added to the resin into a glass microwave reactor, and the solution was bubbled with nitrogen for 30 min. Cp^{*}RuCl(COD) (20 % of the resin loading) was then added, and the reacting mixture was degassed for an additional 15 min. The reactor was then sealed and put into the microwave apparatus and let to react for 2 x 7h at 60 °C, 30 W. After completion, the resin was washed three times with a 0.5 % solution of sodium diethylthiocarbamate in DMF, three times with DMF and three times with methanol and DCM. Finally, the peptide was released via acidic cleavage methodology. **¹H NMR** (300MHz ,D₂O) δ = 7.43 (s, 1 H), 7.35 - 7.18 (m, 5 H), 7.17 - 7.07 (m, 2 H), 6.90 - 6.79 (m, 2 H), 4.96 - 4.88 (m, 2 H), 4.63 - 4.62 (m, 1 H), 4.29 - 4.03 (m, 2 H), 4.01 (d, *J* = 8.1 Hz, 0 H), 4.03 - 3.96 (m, 1 H), 3.66 (d, *J* = 14.1 Hz, 1 H), 3.26 - 3.05 (m, 4 H), 3.04 - 2.84 (m, 2 H) **HRMS** (ESI⁺) *m/z* calcd for C₂₈H₃₂N₈O₇ (M + H)⁺ 593.2467 found 593.2609 Δ=14.2 mDa

H-Tyr-c[D-Dab(N₃)-Phe-D-Pra]-OH (1,5-triazole) (45).



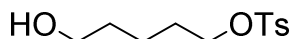
Compound was synthesized following the same methodology as compound **44**. **¹H NMR** (300MHz, D₂O) δ = 7.61 (s, 1 H), 7.38 - 7.00 (m, 7 H), 6.97 - 6.65 (m, 2 H), 4.62 - 3.96 (m, 4 H), 3.59 - 2.57 (m, 6 H) **¹³C NMR** (101MHz, D₂O) δ = 174.0, 173.2, 163.2, 162.8, 155.3, 155.2, 133.5, 130.9, 130.9, 129.1, 128.7, 127.4, 125.6, 114.9, 55.0, 54.7, 54.2, 53.8, 37.1, 36.2, 34.5 **HRMS** (ESI⁺) m/z calcd for C₂₆H₂₉N₇O₆ (M + H)⁺ 536.2252 found 536.2371 Δ =11.9 mDa

H-Tyr-D-Cys-Gly-Phe-Leu-OH (55).



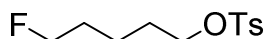
Peptide was synthesized following general solid phase peptide synthesis protocol. During *D*-Cystéine coupling, DIC (3 eq) was used in place of HATU to limit racemization. For the cleaving step, thioanisole and EDT were added to the mixture. **¹H NMR** (300 MHz, CD₃OD-d₄) δ (ppm) 7.30-7.19 (m, 5H), 7.15 (d, 2H, J = 8.5 Hz), 6.81 (d, 2H, J = 8.5 Hz), 4.74 (dd, 1H, J = 5.0 and 9.5 Hz), 4.43-4.34 (m, 2H), 4.15 (t, 1H, J = 7.5 Hz), 3.83-3.75 (m, 2H), 3.22-3.13 (m, 2H), 3.08-2.95 (m, 2H), 2.76, 2.74 (m, 2H), 1.70-1.62 (m, 3H), 0.93 (dd, 6H, J = 6.0 and 15.5 Hz). **¹³C NMR** (75 MHz, CD₃OD-d₄) δ (ppm) 174.2, 172.3, 171.1, 169.5, 169.3, 156.9, 136.8, 130.2, 129.0, 128.0, 126.3, 124.5, 115.4, 56.7, 54.6, 54.1, 50.8, 41.8, 39.9, 37.5, 36.4, 24.5, 21.9, 20.4. **IR** (NaCl) ν (cm⁻¹) 3355-2606 (br), 3033, 1746, 1685, 1522. **HRMS** calculated for C₂₉H₃₉N₅O₇S: 602.2643, found: 602.2647 Δ =0.4 mDa

Tosyloxy-1-pentanol (59).



1,5-Pentanediol (4.0 g, 40 mmol), ptoluenesulfonyl chloride (7.3 g, 42 mmol), and pyridine (3.9 mL, 50 mmol) were dissolved in DCM (20 mL), and the resulting solution was stirred overnight at room temperature. The reaction mixture was diluted with DCM and washed three times with water. The organic layer was dried with MgSO_4 , and the solvent was removed in vacuo. The crude mixture was suspended in methanol to precipitate pentane di(p-toluenesulfonate). The white solid was removed by filtration, and the filtrate was concentrated in vacuo. The resulting crude product was purified by liquid chromatography on silica gel using a gradient of hexane and ethyl acetate (40:60). $^1\text{H NMR}$ (300MHz, CDCl_3 -d): δ (ppm) 7.80-7.83 (d, 2H, $J = 9\text{Hz}$), 7.36-7.39 (d, 2H, $J = 9\text{Hz}$), 4.04-4.08 (t, 2H, 6Hz), 3.60-3.63 (t, 2H, 6Hz), 2.48 (s, 3H), 1.71-1.74 (m, 2H), 1.52-1.55 (m, 2H), 1.42-1.44 (m, 2H).

(5-Fluoropentyl) tosylate (60).

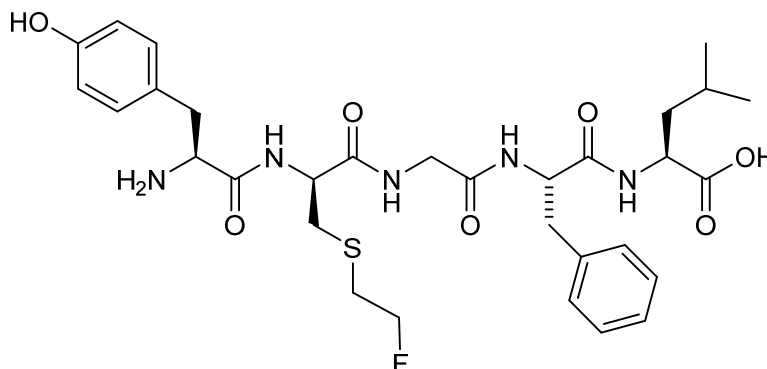


5-Tosyloxy-1-pentanol (1g, 3.87 mmol) and diethylaminosulfur trifluoride (DAST) (2.6 mL, 19.4 mmol) were dissolved in DCM (20 mL) at 0 °C, and the resulting solution was allowed to gradually reach room temperature with stirring over 4 h. The reaction mixture was diluted with DCM (100 mL) and washed with brine (100 mL \times 1) and twice with water (100 mL \times 2). The organic layer was dried with MgSO_4 , and the solvent was removed in vacuo. The product was purified by liquid chromatography on silica gel using petrol ether and ethyl acetate (90:10), to give the title compound as colorless oil in 70% yield. $^1\text{H NMR}$ (300MHz, CDCl_3 -d): δ (ppm) 7.81-7.84 (d, 2H, $J = 9\text{Hz}$), 7.37-7.40 (d, 2H, $J = 9\text{Hz}$), 4.49-4.53 (t, 1H, 6Hz), 4.33-4.37 (t, 1H, 6Hz), 4.05-4.09 (t, 2H, $J = 6\text{Hz}$), 2.4 (s, 3H), 1.70-1.76 (m, 4H), 1.29-1.50 (m, 2H).

General Protocol for Alkylation of Unprotected D-Cys² Leu⁵ enkephaline.

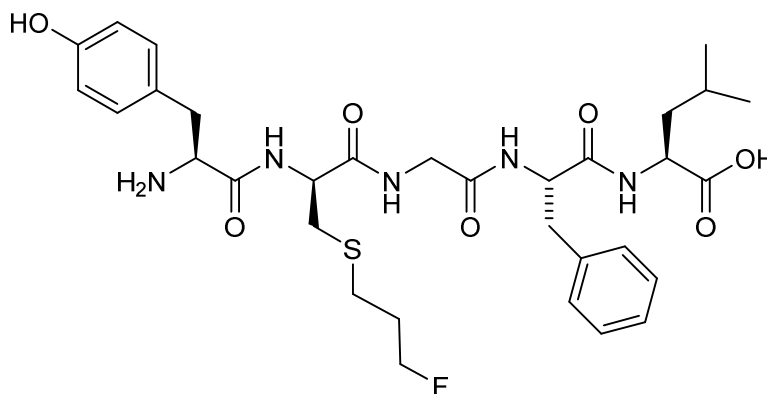
In the 5mL vessel including D-Cys² Leu⁵ Enkephaline (**1**) (10 mg) were added tetramethylguanidine (4eq) and alkylhalide (3eq or 5eq) in the lowest amount ACN. The mixture was heated at 40 °C and stirred under inert gas. The progress of reactions were controlled with HPLC after 10-20 min. Then, 1mL water was added and the solution was frozen and lyophilized. The peptides were purified using Biotage and the fractions with purities more than 95% or higher were combined, frozen and lyophilized.

D-Cys (CH₂H₂F)² Leu⁵ enkephaline (56).



The title peptide was obtained as a white solid (9.15mg, 85%). **¹H NMR** (300MHz, CH₃OD-d₄): δ (ppm) 7.20-7.33 (m, 5H), 7.15-7.18 (d, 2H, J = 6Hz), 6.80-6.83 (d, 2H, J = 6Hz), 4.71-4.77 (m, 2H), 4.48-4.68 (dt, 2H, J_{FH} = 48Hz, J₁₂ = 6Hz), 4.37-4.42 (m, 1H), 4.11-4.21 (m, 1H), 3.69-3.84 (m, 2H), 3.15-3.25 (m, 2H), 2.88-3.02 (m, 4H), 2.73-2.85 (m, 2H), 1.59-1.74 (m, 3H), 0.91-0.97 (dd, 6H, J = 12Hz, 6Hz). **¹³C NMR** (101 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 173.94, 156.54, 137.72, 130.55, 129.24, 128.03, 115.29, 83.36, 40.14, 39.93, 39.73, 39.52, 39.31, 39.10, 38.89, 31.10, 22.87, 21.37. **HRMS** calcd for C₃₁H₄₂FN₅O₇S: 647.7, found: 649.2 Δ=11.9 mDa

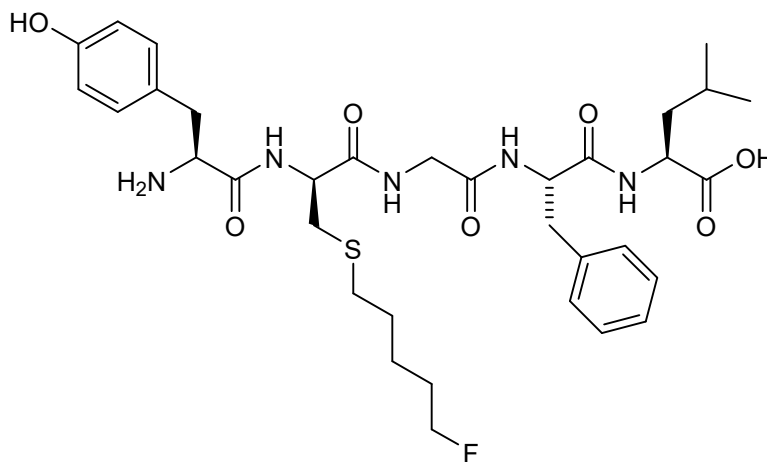
D-Cys (CH₂CH₂CH₂F)² Leu⁵ enkephaline (57).



The title peptide was obtained as a white solid (8.79 mg, 80 %). **¹H NMR** (300MHz, CH₃OD-d₄): δ (ppm) 7.19-7.34 (m, 5H), 7.15-7.17 (d, 2H, J = 6Hz), 6.80-6.82 (d, 2H, J = 6Hz), 4.71-4.78 (m, 2H), 4.45-4.61 (dt, 2H, J_{FH} = 48Hz, J₁₂ = 6Hz), 4.34-4.40 (m, 1H), 4.11-4.25 (m, 2H), 3.14-3.25 (m, 2H), 2.85-3.07 (m, 4H), 2.63-2.73 (bt, 2H), 1.89-2.05 (m, 2H), 1.59-1.73 (m, 3H), 0.89-0.98 (dd, 6H, J = 12Hz, 6Hz). **¹³C NMR** (101 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 173.93, 171.14, 169.80, 168.03, 156.55, 137.71, 130.55, 129.24, 128.02, 126.28, 115.27, 83.23, 81.61, 53.62, 50.34, 40.14, 39.93, 39.73, 39.52, 39.31, 39.10,

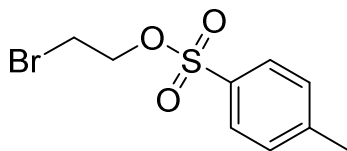
38.89, 29.80, 29.60, 26.88, 24.30, 22.87, 21.37. **HRMS** calculated for C₃₂H₄₄FN₅O₇S: 661.3, found: 663.1.

3.5.3 D-Cys (CH₂H₂CH₂CH₂CH₂F)² Leu⁵ enkephaline (58).



The title peptide was obtained as a white solid (6.88 mg, 60 %). **¹H NMR** (400 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) 9.32-9.34 (bs, 1H), 8.71-8.76 (bd, 1H), 8.42-8.46 (m, 1H), 8.29-8.34 (bd, 1H), 8.04-8.06 (d, 1H, *J* = 8Hz), 7.15-7.27 (m, 5H), 7.06-7.08 (bd, 2H), 6.68-6.71 (bd, 2H), 4.34-4.49 (dt, 2H, *J*_{FH} = 48Hz, *J*₁₂ = 6Hz), 4.17-4.24 (m, 1H), 3.96-3.97 (m, 1H), 3.64-3.71 (m, 2H), 2.96-3.06 (m, 2H), 2.67-2.81 (m, 3H), 1.59-1.65 (m, 3H), 1.51-1.54 (m, 4H), 1.39-1.51 (m, 2H), 0.89-0.91 (d, *J* = 6.4Hz, 3H), 0.84-0.95 (d, *J* = 6.4Hz, 3H). **¹³C NMR** (101 MHz, DMSO) δ (ppm): 173.95, 171.11, 168.05, 137.72, 130.53, 129.24, 128.02, 117.99, 115.25, 110.29, 84.50, 82.89, 30.97, 29.48, 28.44, 23.98, 22.87, 21.38. **HRMS** calculated for C₃₄H₄₈FN₅O₇S: 689.3, found: 691.0.

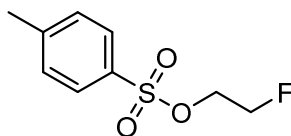
2-bromoethyl 4-methylbenzenesulfonate (61)



To a solution of 2-Bromoethanol (1,00 g; 8.02 mmol; 1.00eq) in pyridine (3.30 mL) at 0 °C, was added portionwise *p*-toluenesulfonyl chloride (7.3 g, 42 mmol), and the reacting mixture was stirred at RT for 16h. The reaction mixture was diluted with DCM (10 mL) and washed three times with water (10 mL).

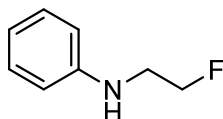
The organic layer was dried with MgSO_4 , and the solvent was removed in vacuo. The crude mixture was suspended in methanol to precipitate pentane di(p-toluenesulfonate). The white solid was removed by filtration, and the filtrate was concentrated in vacuo. The resulting crude product was purified by liquid chromatography on silica gel using a gradient of hexane and ethyl acetate (30:70), to give the title compound as a transparent oil (2.01 g; 90%). **^1H NMR** (300 MHz, $\text{CDCl}_3\text{-d}$) δ = 7.88 - 7.78 (m, 2 H), 7.44 - 7.34 (m, 2 H), 4.31 (t, J = 6.6 Hz, 2 H), 3.50 (t, J = 6.5 Hz, 2 H), 2.48 (s, 3 H) **HRMS** (ESI^+) m/z calcd for $\text{C}_9\text{H}_{11}\text{BrO}_3\text{S}$ ($\text{M} + \text{H}$)⁺ 277.9612 found 277.9618 Δ =0.6 mDa

2-Fluoroethyl 4-methylbenzenesulfonate (68).



Tosyl chloride was added in four portions to a solution of 2-fluoroethanol (5.0 g; 78.1 mmol; 1 eq) in pyridine (25 mL) at room temperature. After 16 h of stirring at RT, the reacting mixture was concentrated over vacuum. The remaining residue was then dissolved in 1N HCl (50 mL) and extracted three times with chloroform (3x 50 mL). The organic layers were then gathered and dried over MgSO_4 and concentrated in vacuo. The crude product was finally purified via flash chromatography using 30/70 EtOAc/hexane eluant, to yield the title compound (9 g, 53 %). **^1H NMR** (400MHz, $\text{CDCl}_3\text{-d}$) δ = 7.81 (td, J = 1.9, 8.4 Hz, 2 H), 7.38 - 7.33 (m, 2 H), 4.65 - 4.61 (m, 1 H), 4.53 - 4.49 (m, 1 H), 4.32 - 4.28 (m, 1 H), 4.25 - 4.21 (m, 1 H), 2.45 (s, 3 H) **^{13}C NMR** (101MHz, $\text{CDCl}_3\text{-d}$) δ = 145.3, 132.7, 130.1, 128.1, 81.5, 79.8, 21.8 **HRMS** (ESI^+) calculated for $\text{C}_9\text{H}_{11}\text{FO}_3\text{S}$: 219.0486 found: 219.0514 Δ =2.8 mDa

N-(2-fluoroethyl)aniline (69).



To a solution of aniline (50 mg; 0.54 mmol; 1 eq) in DMF (2 mL) was added sodium hydride (13 mg; 0.54 mmol; 1 eq) at RT. 2-fluoroethyl 4-methylbenzenesulfonate (117 mg; 0.54 mmol; 1 eq) was then added at RT, and the reacting mixture was stirred at RT for 16 h. Water (10 mL) was then added, and the organic phase was extracted with EtOAc (3x10 mL). The organic layers were then gathered and

dried over MgSO_4 , before being evaporated to dryness over vacuum. The crude residue was then purified by normal phase flash chromatography with a Hexane/EtOAc (100/0 to 20/80) gradient, to give the title compound as an orange oil (35 mg, 46 %). $^1\text{H NMR}$ (400MHz, CDCl_3 -d) δ = 7.25 - 7.16 (m, 2 H), 6.79 - 6.72 (m, 1 H), 6.68 - 6.61 (m, 2 H), 4.69 (t, J = 5.0 Hz, 1 H), 4.57 (t, J = 4.8 Hz, 1 H), 3.98 (br. s., 1 H), 3.45 (td, J = 4.8, 26.5 Hz, 2 H) $^{13}\text{C NMR}$ (101MHz, CDCl_3 -d) δ = 147.7, 129.5, 118.2, 113.3, 83.4, 44.4 **HRMS** (ESI+) calculated for $\text{C}_8\text{H}_{10}\text{FN}$: 140,087 found: 140,0917 Δ =4.7 mDa

Radiochemistry.

Aqueous [^{18}F]fluoride was pumped from the cyclotron reactor and trapped on a QMA cartridge (30 mg) (previously conditioned with 2x10 mL 1M Na_2CO_3 and 10 mL water). MeCN (2 mL) was eluted through the column to eliminate residual water, and the reactor was dried by a nitrogen flow (10 psi) for 1:45 min. The fluoride was then transferred to the reactor by eluting the QMA with a solution of TEAB (1 mL; 10 mg/mL). The reactor was dried again by heating at 150 °C for 6:30 min, or until upper temperature probe climb to 90 °C. The reactor was cooled down to 30 °C with an external flow of compressed air. Ethylene sulfite (25 μL in 1 mL MeCN) was then added to the reacting mixture, and this was heated at 105 °C for 21 min. The reaction mixture was cooled down to 30 °C, and the solution was passed through a QMA light cartridge and transferred to a second reaction vial containing triflic anhydride (90 μL). MeCN (0.5 mL) was passed through the previous QMA cartridge to recover remaining solution which may have been trapped. This solution was bubbled with nitrogen for 1 min, and transferred to the harvest vial via a alumina N cartridge (280 mg). Then, the obtained solution can be reacted with the ligand to label.

Cell culture.

HEK293 (Human embryonic kidney) cells stably expressing the mouse DOP or MOP-obtained from Dr Richards Howells (New Jersey Medical School, Newark, NJ, USA)- were grown at 37 °C in DMEM supplemented with 10 % fetal bovine serum and 10 IU penicillin, 100 mg/L streptomycin and 2 mM glutamine. Plasmid was retained by adding 250 mg/L geneticin in media for routinely passing. Cells were maintained in humidified atmosphere of 95 % air and 5 % CO_2

Competitive Binding Assays.

We evaluated the affinity (IC₅₀) of the different compound for DOP or MOP using membrane extracts from stable HEK293 cells. HEK293 cells grown to confluence in 150 mm Petri dishes, were frozen at -80 °C until use. On the day of the experiment, the cells were submitted to a heat shock by placing the petri dishes at 37 °C for 60 sec before returning to ice. The cells were then harvested in ice-cold buffer A (tris-HCl 20 mM, MgCl₂ 5 mM, NaCl 150 mM, PH 7.4) using a cell scraper and centrifuged at 3200 g for 15 min at 4 °C. The pellet containing the membrane extract was resuspended in 1 mL of buffer A. The protein concentration was determined with Bio-Rad DCTM Protein Assay reagents (Bio-Rad Laboratories, Mississauga, ON, Canada) and the pellet was further diluted in buffer A containing 0.01 % BSA and 0.01 % bacitracin and distributed in 96 wells plate. [¹²⁵I]-Deltorphan I (specific activity: ~943 Ci/mmol) or [¹²⁵I]-DAMGO (specific activity: ~943 Ci/mmol) was used to determine the binding affinity of the compounds in a competitive binding assay on Delta Opioid receptor or Mu opioid receptor respectively. Experiments were performed using a membrane concentration of 10-20 µg of proteins/mL and 200000 cpm of the radiolabeled ligand. Non specific binding was determined using 10 µM non-radioactive deltorphan II or DAMGO. Incubations were performed for 60 min at 37 °C with increasing concentration of compound ranging from 10 µM to 1 pM, and the reaction was stopped by filtration using ice-cold buffer A on filtered 96-well plates. Filters were placed in 5 mL tubes, and the radioactivity was determined using a Wizard² Automatic Gamma Counter (PerkinElmer Canada). Data were analyzed using a non-linear fitting analysis, and the EC₅₀ values were determined using GraphPad Prism 7.0 EC₅₀ are expressed as the mean +/- S.E.M. from 3 independent experiments, each performed in duplicate.

BRET signaling.

HEK293 cells were maintained in DMEM supplemented with 10% FBS, 100 IU/mL penicillin, and 100 µg/mL streptomycin at 37 °C in a humidified 5% CO₂ atmosphere. The day prior to transfection, cultured cells were washed with PBS at room temperature, trypsinized, and seeded at 3,000,000 cells in a 10-cm Petri dish. For Rluc2-EPAC-GFP10 transfection, 3000 ng of pcDNA3-3HA-ratMOP with 150

ng of Rluc2-EPAC-GFP10 or 6000 ng of pcDNA3-Flag-ratDOP with 600 ng of Rluc2-EPAC-GFP10 was added to 600 μ L of 150 mM NaCl containing 27 μ g of PEI and ssDNA was added to complement to 9 μ g the total amount of DNA. For Arr2-GFP10 / receptor-Rluc2 transfection, 600 ng of pcDNA3-3HA-ratMOP-Rluc2 or pcDNA3-Flag-ratDOP-Rluc2 with 12000 ng Arr2-GFP10 was added to 600 μ L of 150 mM NaCl containing 37,8 μ g PEI. The mixture was incubated for 20 min before being added to the cultured cells. At 24 h post-transfection, cells were washed with PBS, trypsinized and plated in 96-well white plates (75,000 cells/well) and left for another 24 h. The cells were then equilibrated at room temperature for at least 1 h with 70 μ L stimulation buffer (10 mM Hepes, 1 mM CaCl₂, 0.5 mM MgCl₂, 4.2 mM KCl, 146 mM NaCl, 5.5 mM glucose, pH 7.4). Coelenterazine 400A (a Rluc2 substrate) was added to a final concentration of 5 μ M, 10 min before stimulation. For the EPAC assay, cells were first stimulated with 3 μ M forskolin to increase cAMP. Cells were stimulated with ligand ranging from 10 μ M to 1pM and incubated for 10 min prior to signal acquisition. BRET2 signals were measured using a TECAN M1000 fluorescence reader (TECAN, Grödig, Austria). RLuc2 and GFP10 emissions were collected in the 400–450 nm window (RLuc2) and 500 to 550 nm window (GFP10). The BRET2 signal was calculated as the ratio of light emitted by the acceptor GFP10 over the light emitted by the donor RLuc2. For each assay, data were normalized as percentage of the maximal deltorphin II (DOP) or DAMGO (MOP) response. All data were analyzed using the nonlinear curve fitting equations in GraphPad Prism (v7.0; GraphPad Software, La Jolla, CA) to estimate the pEC₅₀ values of the curves for the different pathways. Results are expressed as the mean \pm SEM. from 5 (DOP) or 4 (MOP) independent experiments, each performed in triplicate. Statistical analysis was performed with. ***, $p < 0.001$; One-way ANOVA followed by Tuckey's multiple comparison test.

Molecular modelisation.

Calculations were carried on Molecular Operating Environment (MOE),²⁶⁶ using the structure of 1.8 Å human d-(PDB 4N6H)¹²² opioid 7TM receptor as template. The receptor was first prepared using the “structure preparation tool”, to fix the constitutive errors and correct the protonation states (*Protonate3D*). The different peptides were drawn into the receptor and starting from the native ligand (Natrindole), with the help of the “*builder*” tool. The obtained ligand was then docked into the receptor, using the general docking protocol of MOE (Receptor: *Receptor+Solvent*; Site: *Ligand Atoms*; Ligand: *Ligand Atoms*). First, conformation of the ligand backbone was kept fixed (“*no rotation*”).” *Triangle*

Matcher” (Timeout: 300 s; Returned poses: 1000) was used as placement method and scored with “*London dG algorithm*” (30 poses). The different poses were refined on the rigid receptor using “*GBVI/WSA dG*” algorithm (5 poses). The best pose was then selected manually, based on the best docking score, and by the presence of important the essentials interactions between the Phenolic ring and His 278 via two water bridges, and ammonium with Asp 128. The complex was then minimized with *Amber10: EHT* forcefield before prior optimization. In the second step, the previously chosen pose was kept rigid (select none), and was placed using “*Triangle matcher*” (Timeout: 300 s; Returned poses: 1000) and scored with *London dG* (30 poses). Refinement was done using “*Induced Fit*” (Cutoff: 15 °; Side Chains: Tether: 10; Termination Criterion: Gradient 0.01, Iterations 500), scored with “*GBVI/WSA dG*” (5 poses). Once again, best pose was selected via it docking score and the presence of essentials interactions with the receptor for biological activity.

Partition coefficient (logD_{7.4}) determination.

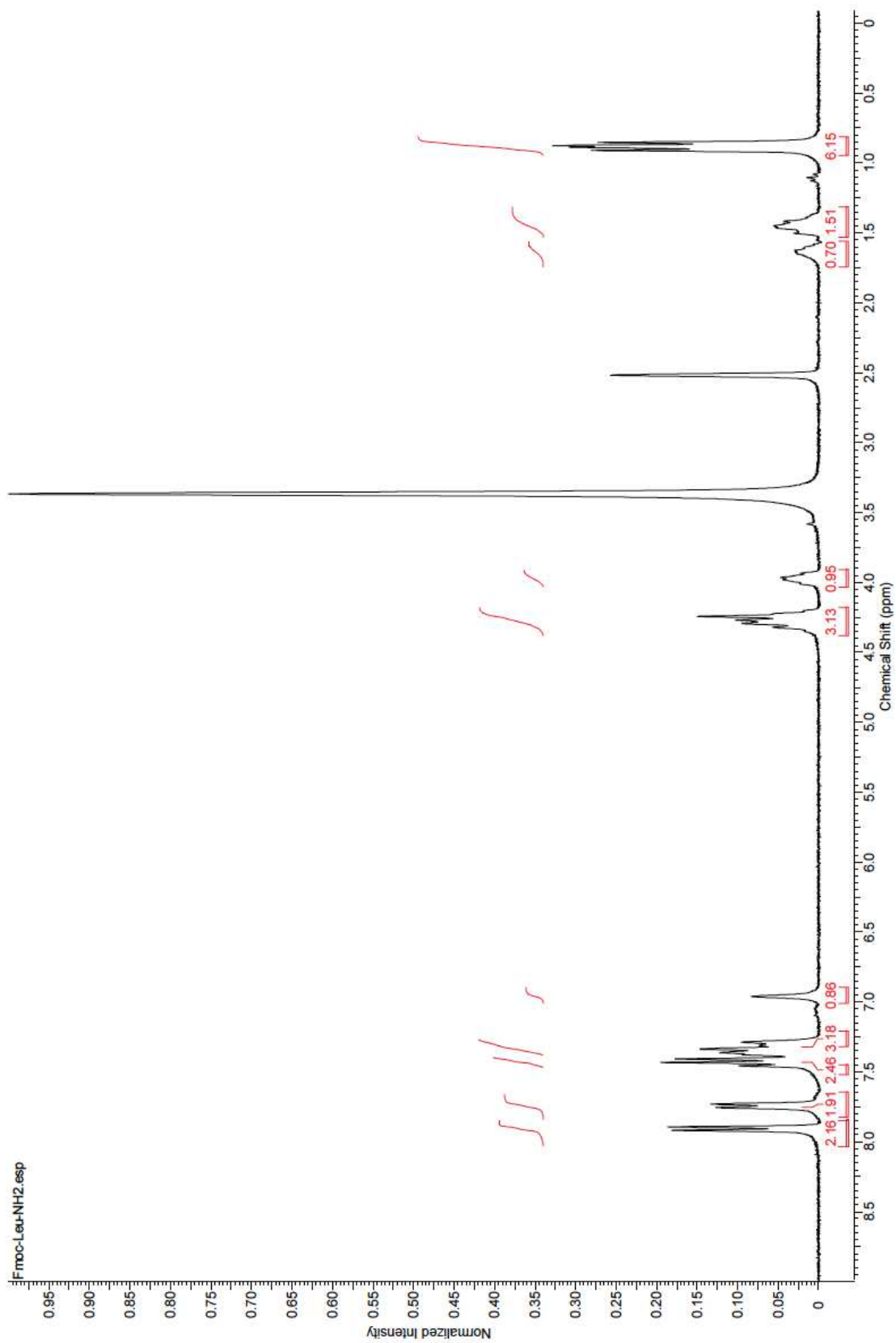
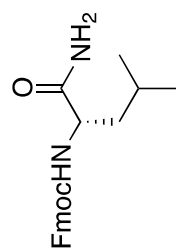
The determination of the distribution coefficient (logD) was performed using a modified version of the shake flask method. Before the experiment, octanol and phosphate buffer (PBS pH 7.4) were mixed together for 24 h to allow saturation of each solution. The mixture was allowed to rest, and the phases were separated and used as solvents in the coefficient measurement. Each peptide (0.1 mg) was placed in a vial to which saturated PBS (1 mL) and octanol (0.5 mL) were added. The vial was then shaken mechanically for 10 min. The mixture was allowed to rest for 30 min or until phase separation was completed. Aliquots of both phases were taken and injected in an HPLC instrument (10 µl of each aliquot was injected in an Agilent 1100 series HPLC, column: Agilent Eclipse Plus C-18 column, 50 mm X 3.0 mm, 1.8 µm; solvent A, 0.1% TFA in water; solvent B, 0.1% TFA in acetonitrile; 10-90% B in A over 60 min; flow rate, 0.4 mL/min; UV detection at 210 nm). The retention time of each peptide was already known from the HPLC purity analysis of each peptide. The octanol peak did not interfere with the experiment. The area under the curve (AUC) of the corresponding peak was integrated for each phase injected. The logD for each peptide was calculated as follows: $\log D_{7.4} = \log_{10} (\text{AUC octanol phase} / \text{AUC PBS phase})$.

Plasma stability.

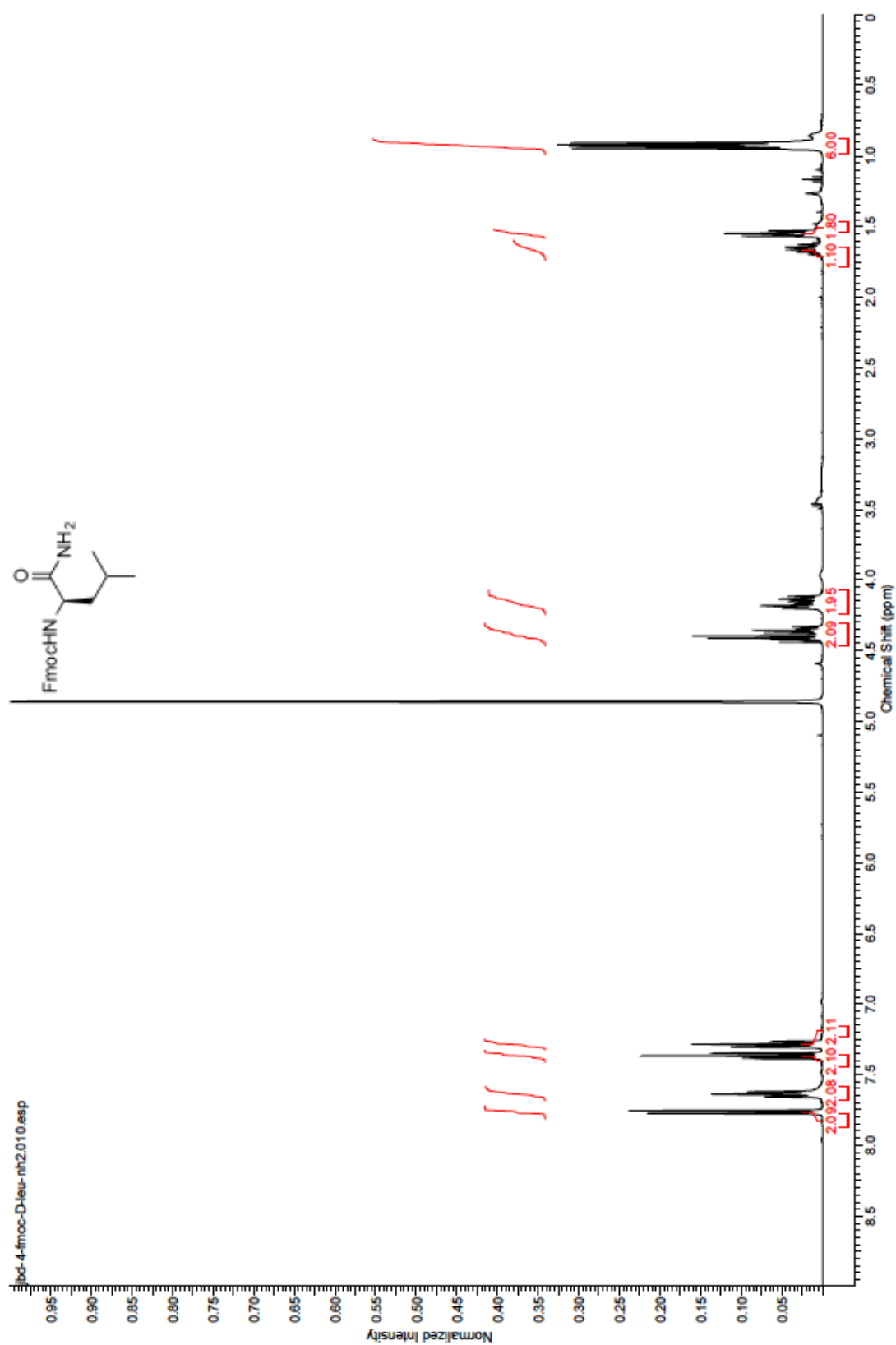
Plasma was prepared from two male Sprague–Dawley rats (300–350 g; Charles River Laboratories, St-Constant, QC, Canada). All animal procedures were approved by the Ethical Committee for Animal Care and Experimentation of the Université de Sherbrooke (protocol #234-14) and were performed in accordance to the regulations of the Canadian Council on Animal Care (CCAC). Briefly, rats were anesthetized with isoflurane (3% isoflurane with 97% medical air) and exsanguinated using an 18G-11/2 needle connected to a vacutainer containing EDTA. The blood was rapidly transferred to 1.5 mL tubes and centrifuged at 1600 g for 15 min at 4°C. The plasma was then stored at –80°C in 500 µL aliquots until use. The stability of Leu-enkephalin and its analogue was determined in plasma diluted to 50% with saline. Therefore, plasma (25 µL) was incubated at 37°C for 15 min before the addition of the peptide solution (25 µL of a 100 µM isotonic sodium chloride solution; 0.9% w/v). At each indicated time point (0, 1, 2, 5, 10, 15, 20, 30, 60, 120, 180, 240 min), the aliquot was quenched with 100 µL of a methanol solution containing 20 µM Fmoc-Leu-OH as an internal standard. The resulting solutions were centrifuged at 13 000 rpm for 15 min at 4°C on tubes equipped with 0.2 µM PVDF centrifugal filters (Canadian Life Science, Peterborough, ON, Canada). A volume of 5 µL of the resulting supernatant was analyzed on an analytical Water H Class Acquity UPLC coupled with a SQ detector 2 and a PDA eλ detector (200 to 400 nm) and paired with an Acquity UPLC CSH C18 column, 1.7 µM, 2.1 Å ~ 50 mm, flow 0.8 mL/min, starting with 0.1% formic acid in water, then to 95% acetonitrile containing 0.1% formic acid in 1.3 min. Area under the curve of the peak corresponding to the extracted mass chromatogram was then measured for both the peptides and the internal standard on the total ion current (T.I.C.) chromatogram and were used for quantification (using the ratio peptide/standard). Values were reported over the 0 min incubation time point to determine the half-life ($t_{1/2}$) using the GraphPad Prism one-phase decay tool. The result are the mean +/- SEM of 3 independent experiments.

ANNEXE 2 : SPECTRES DE RÉSONANCE MAGNÉTIQUE NUCLÉAIRE DES PROTONS

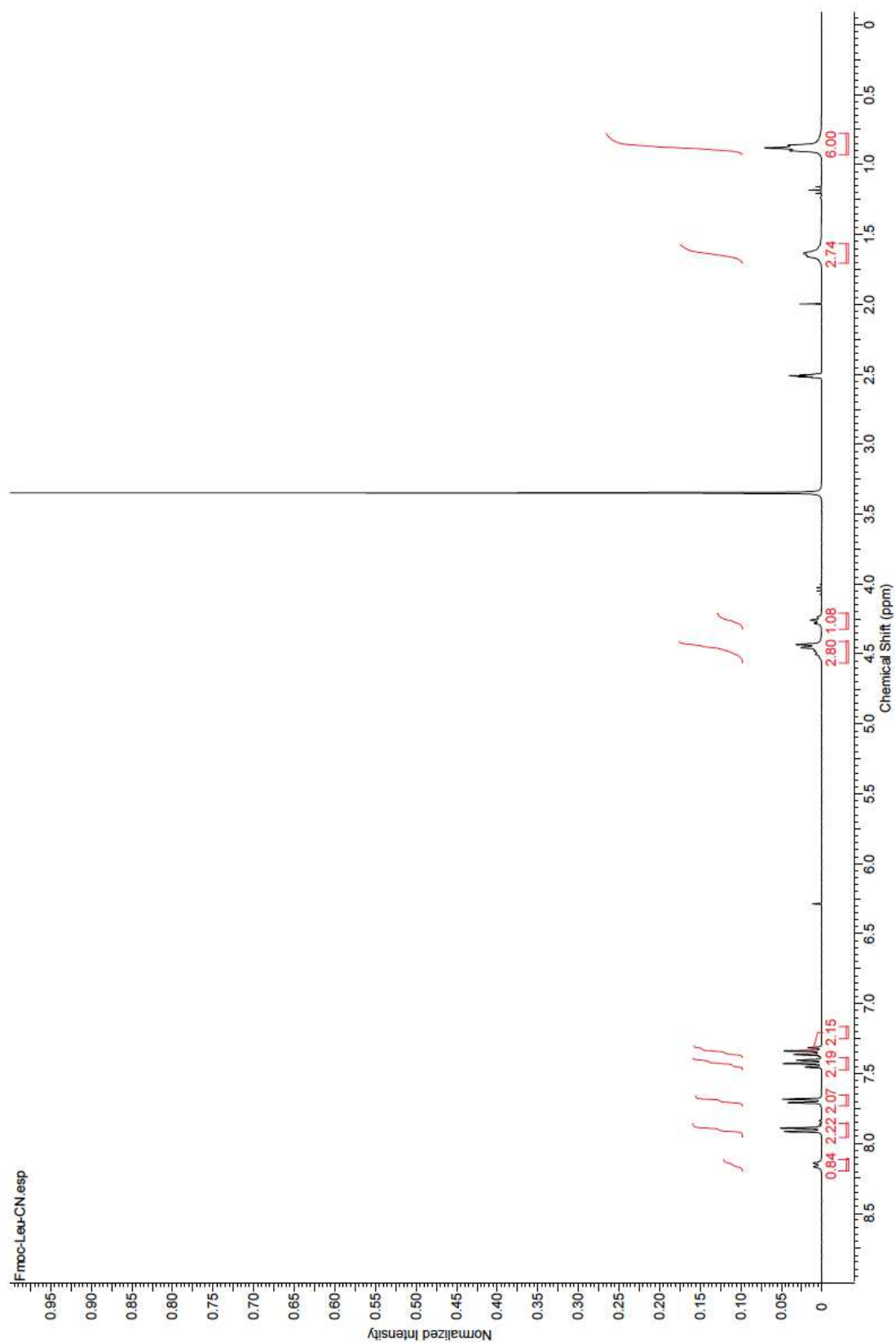
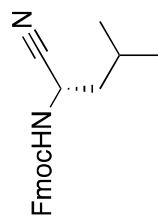
Fmoc-Leu-NH2 (10a)



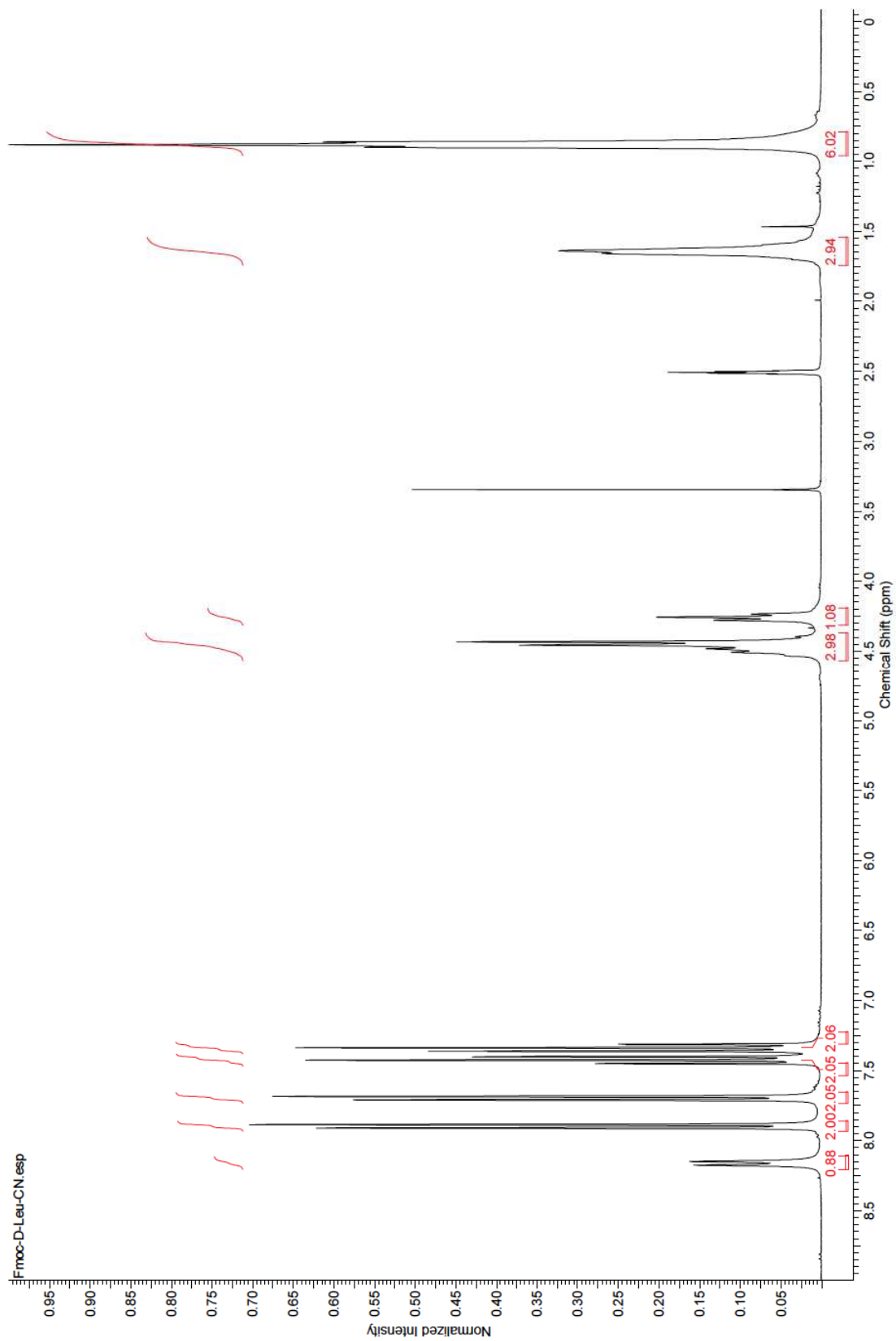
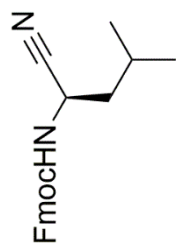
Fmoc-D-Leu-NH₂ (10b)



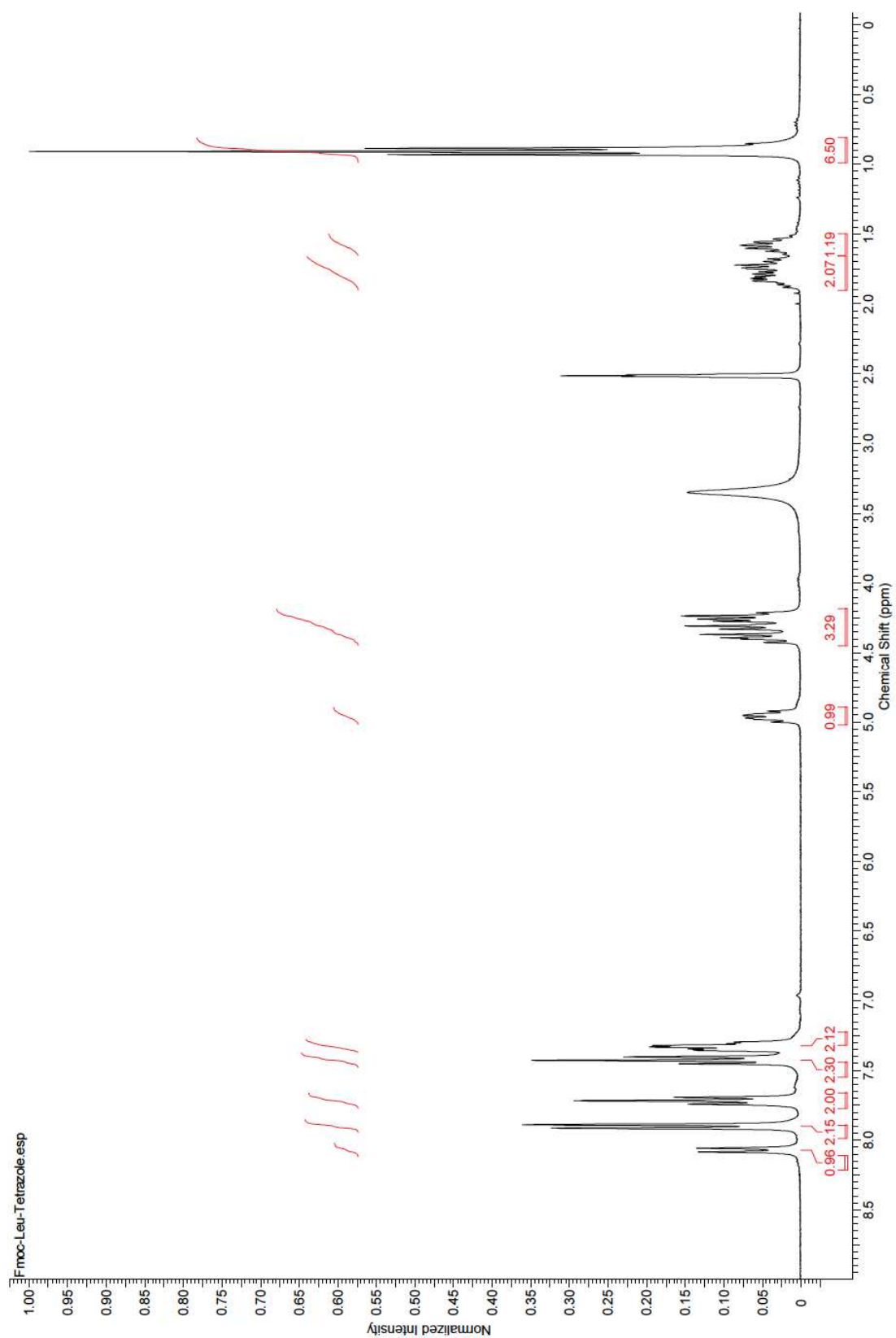
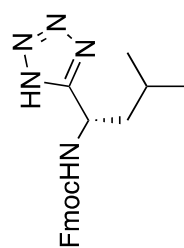
Fmoc-Leu-CN (11a)



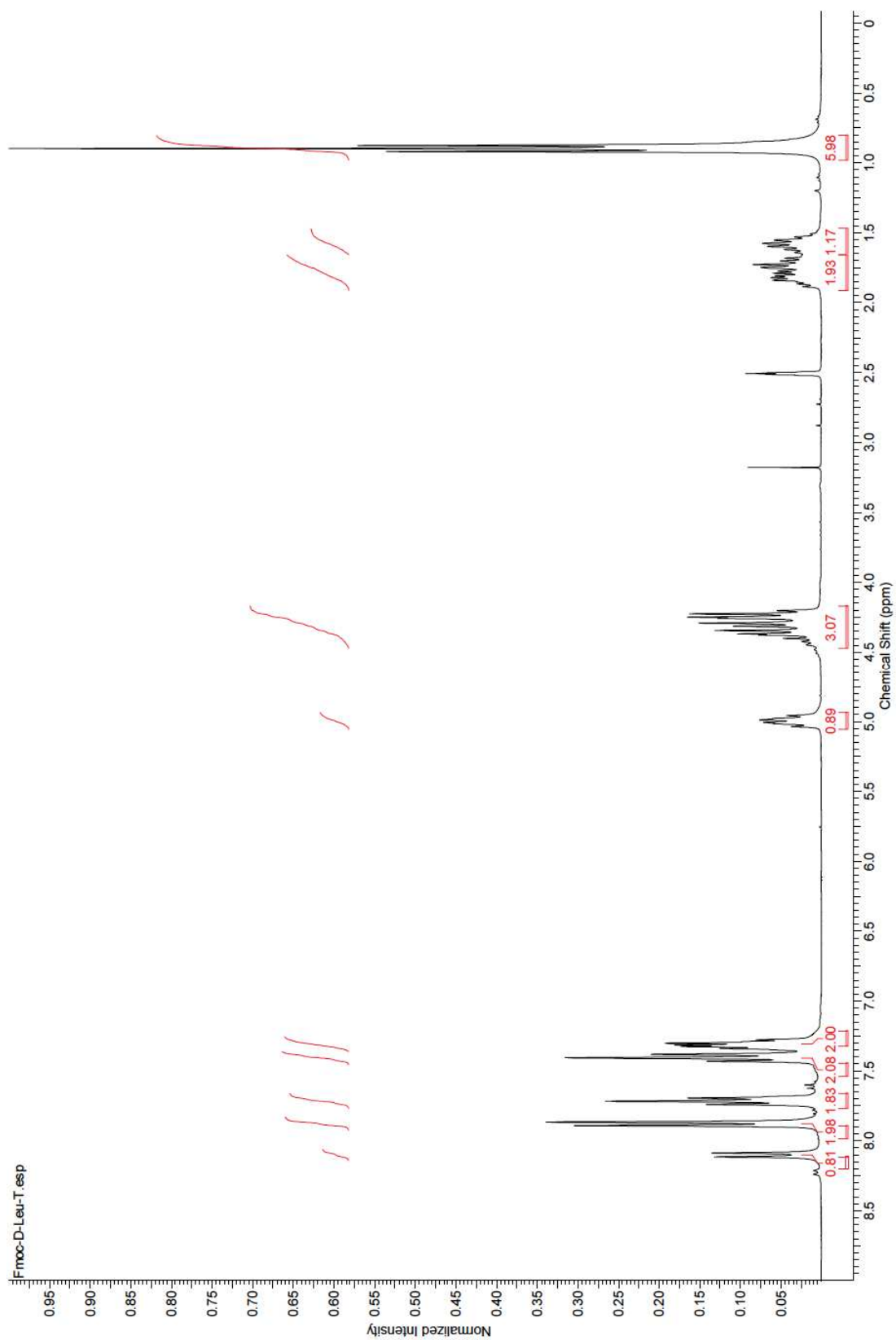
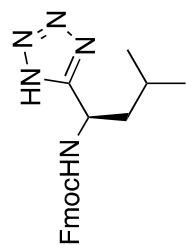
Fmoc-D-Leu-CN (11b)



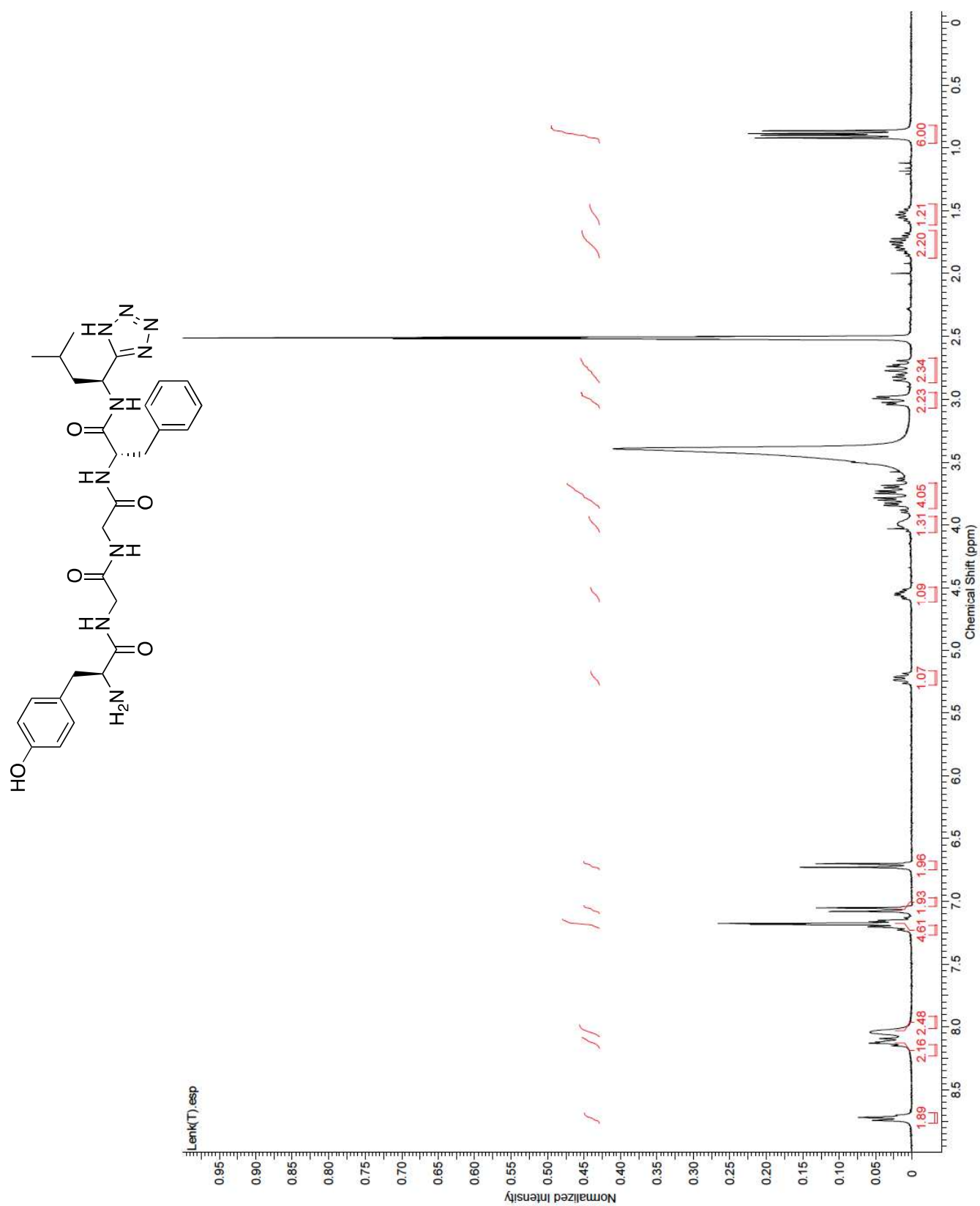
Fmoc-Leu-Tetrazole (12a)



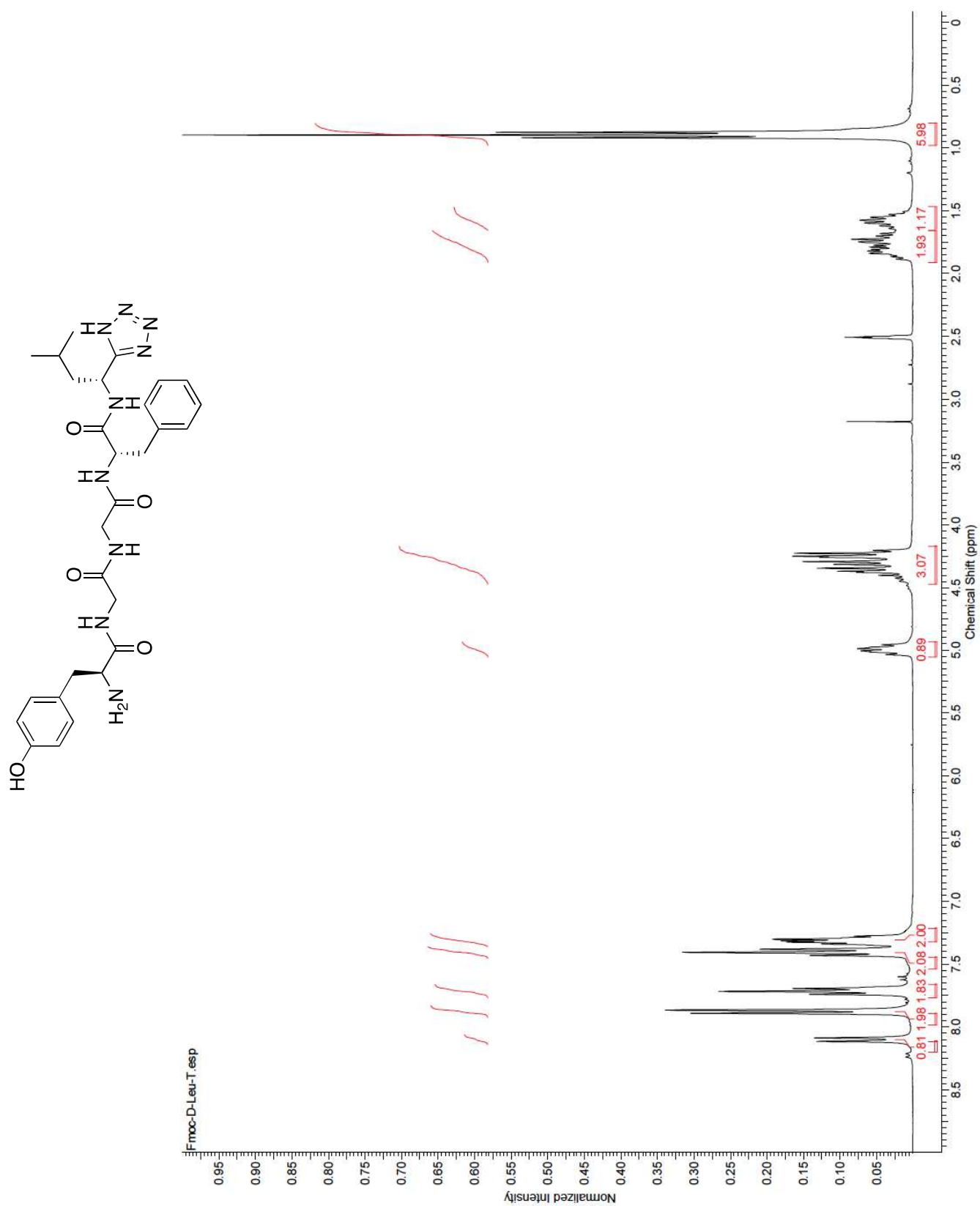
Fmoc-D-Leu-Tetrazole (12b)



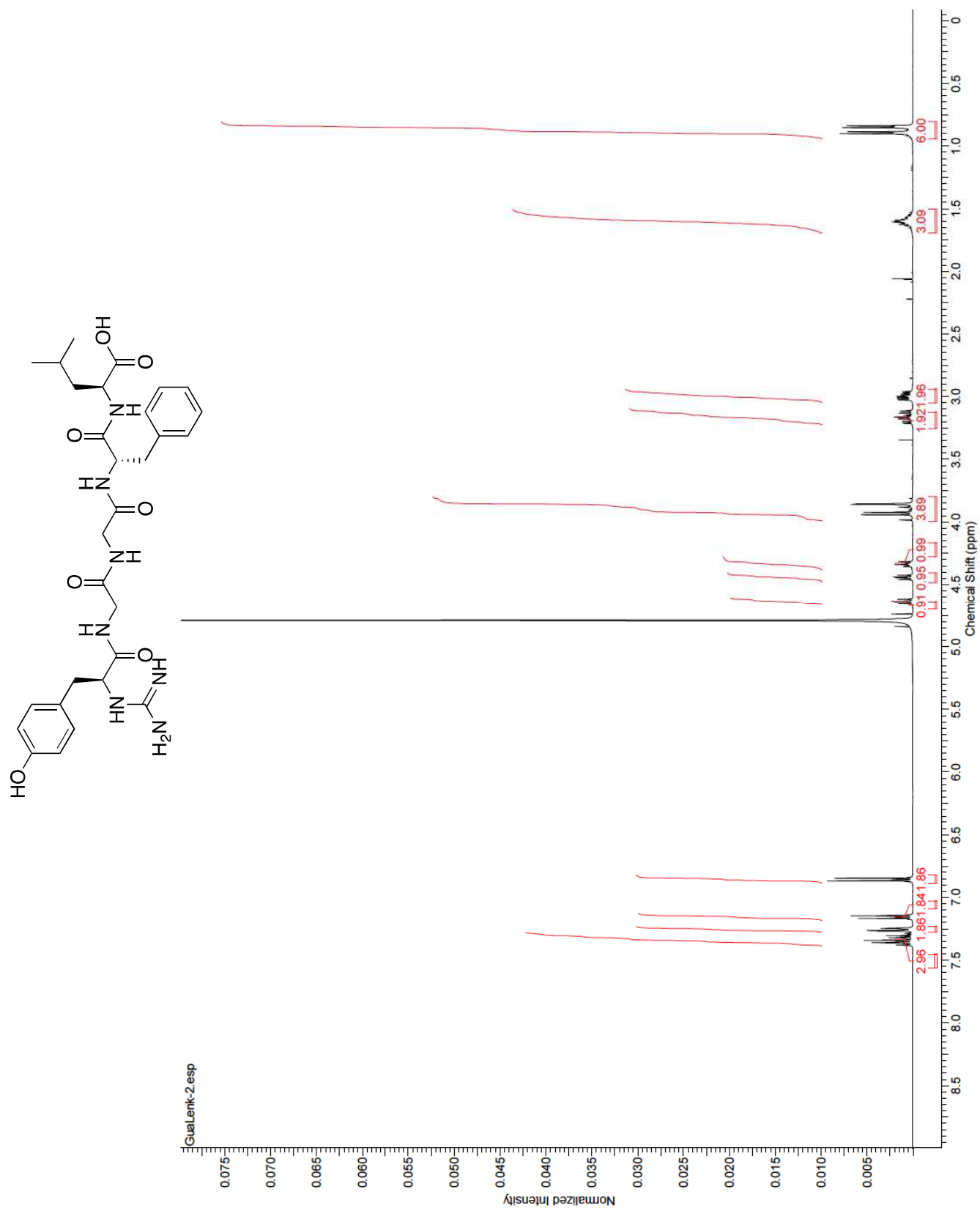
Leu-Enkephalin-Tetrazole (2)



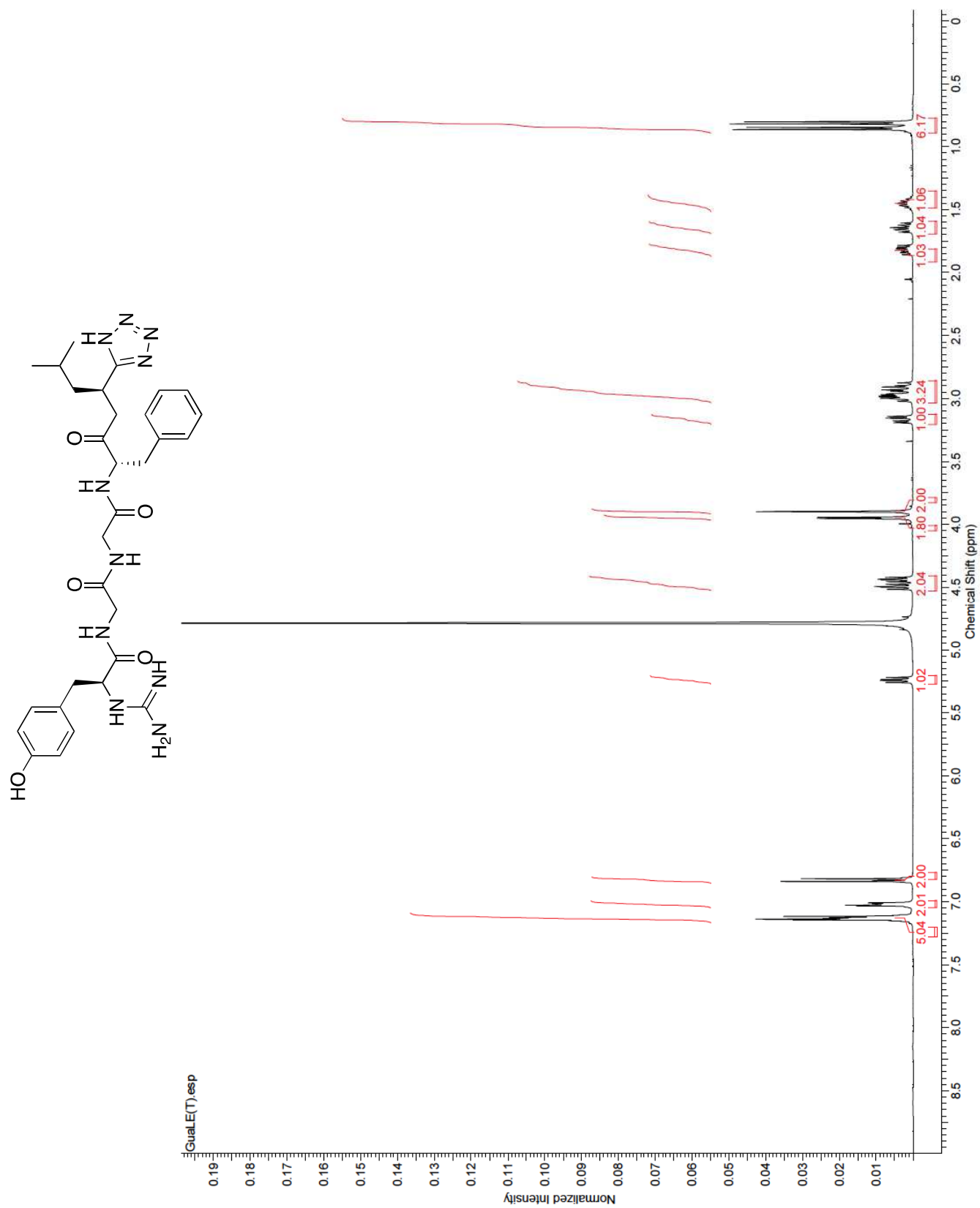
D-Leu-Enkephalin-Tetrazole (3)



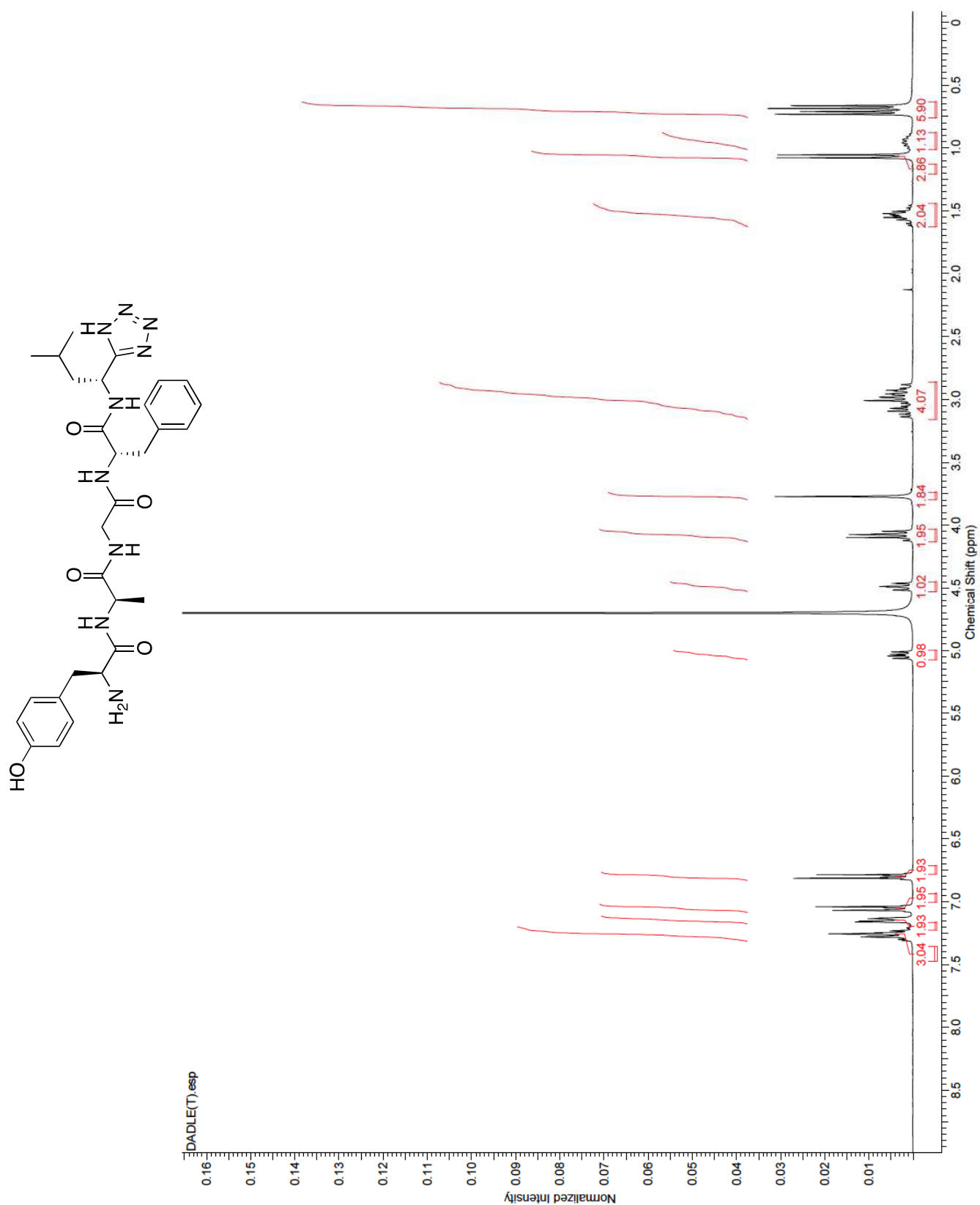
Guanidyl-Leu-Enkephalin (4)



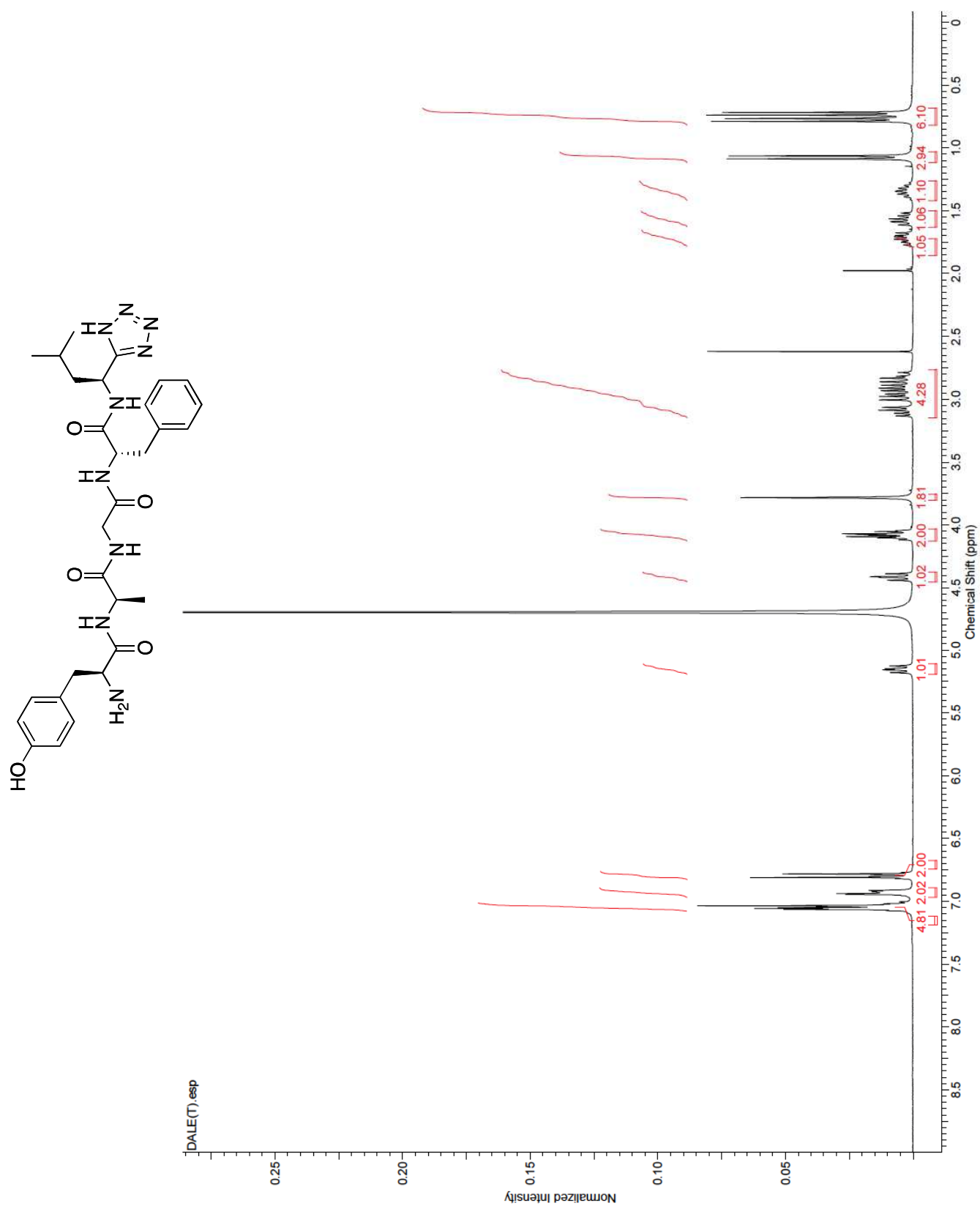
Guanidyl-Leu-Enkephalin-Tetrazole (5)



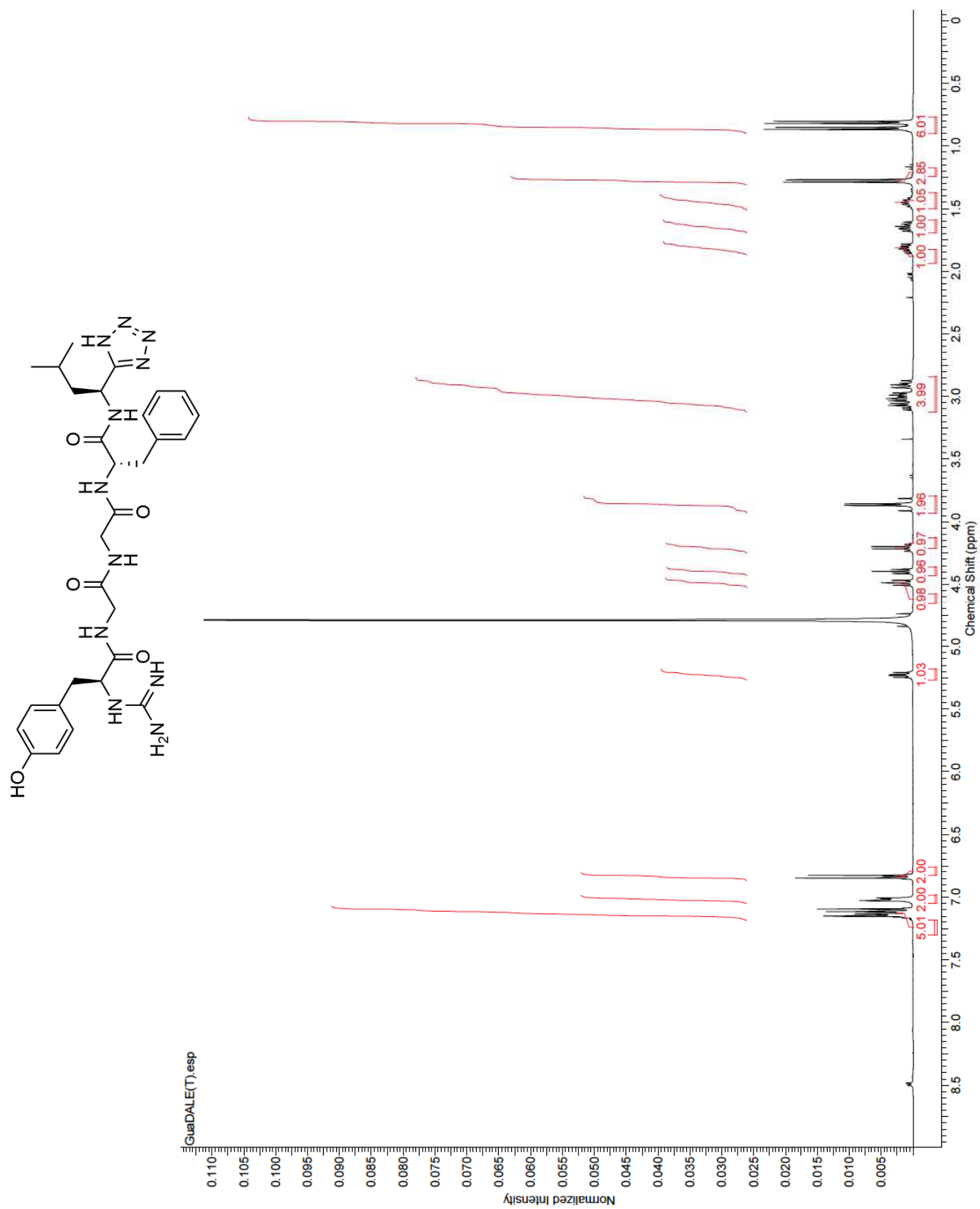
D-Ala-D-Leu-Enkephalin-Tetrazole (6)



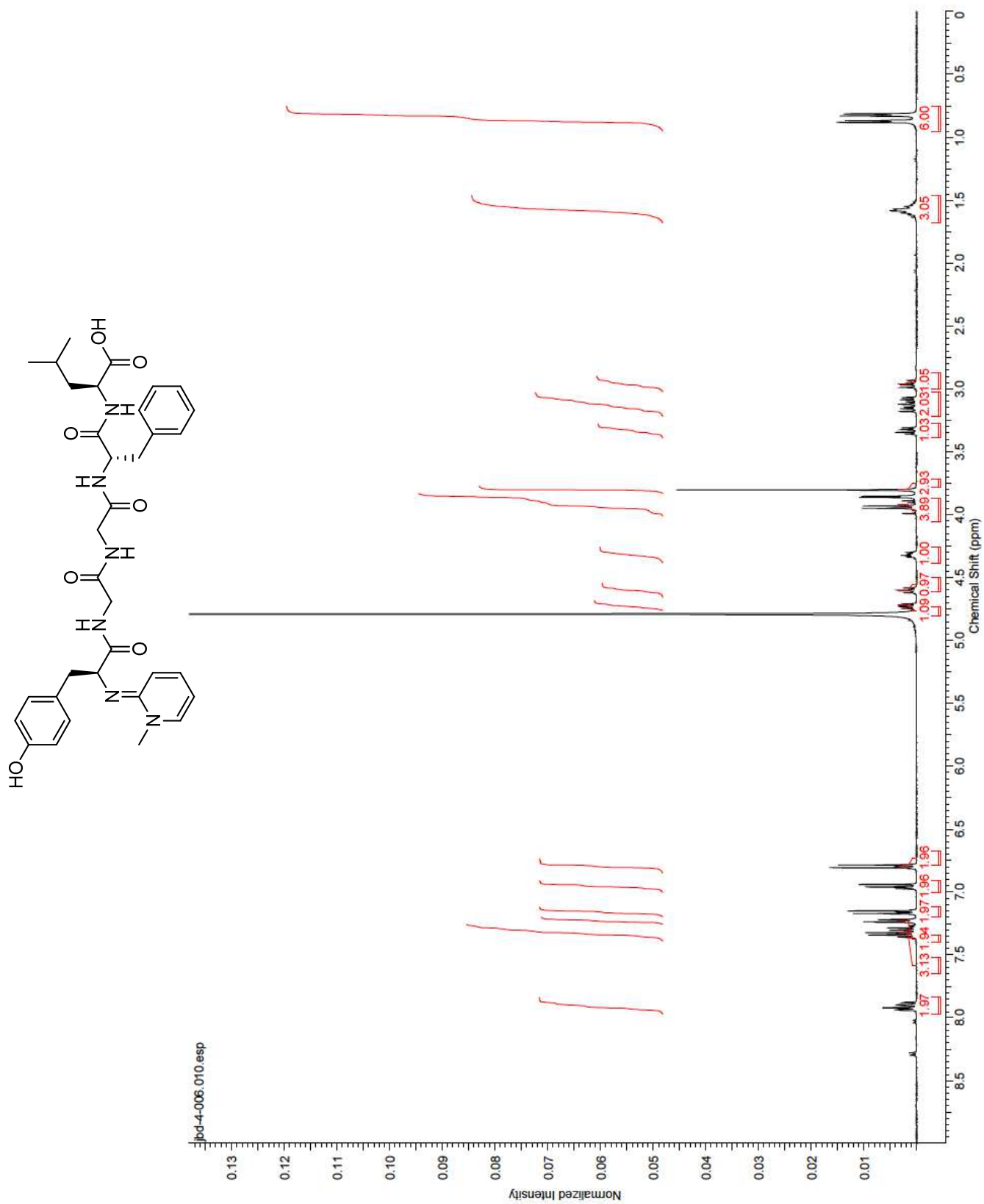
D-Ala-Leu-Enkephalin-Tetrazole (7)



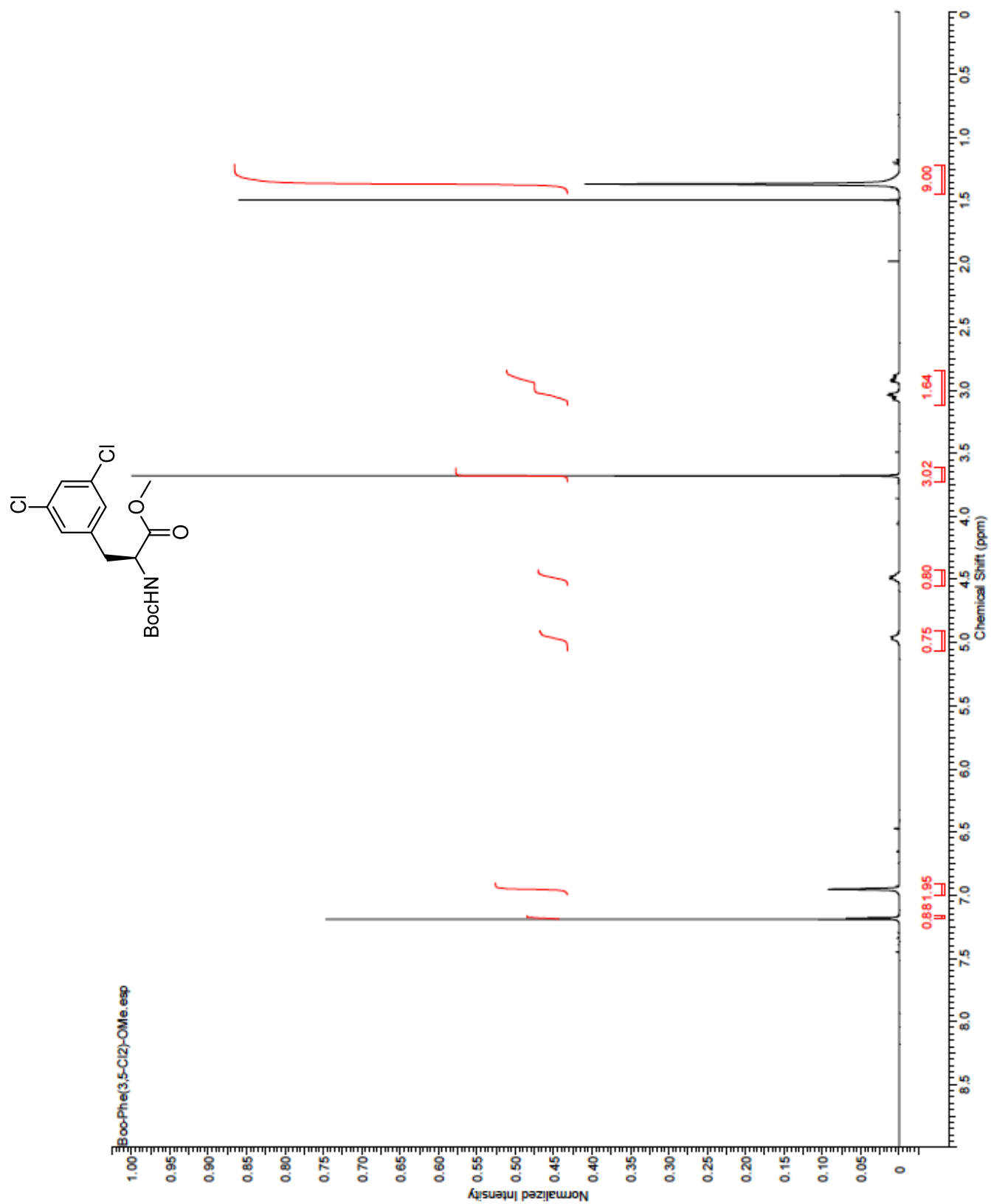
Gua-D-Ala-Leu-Enkephalin-Tetrazole (8)



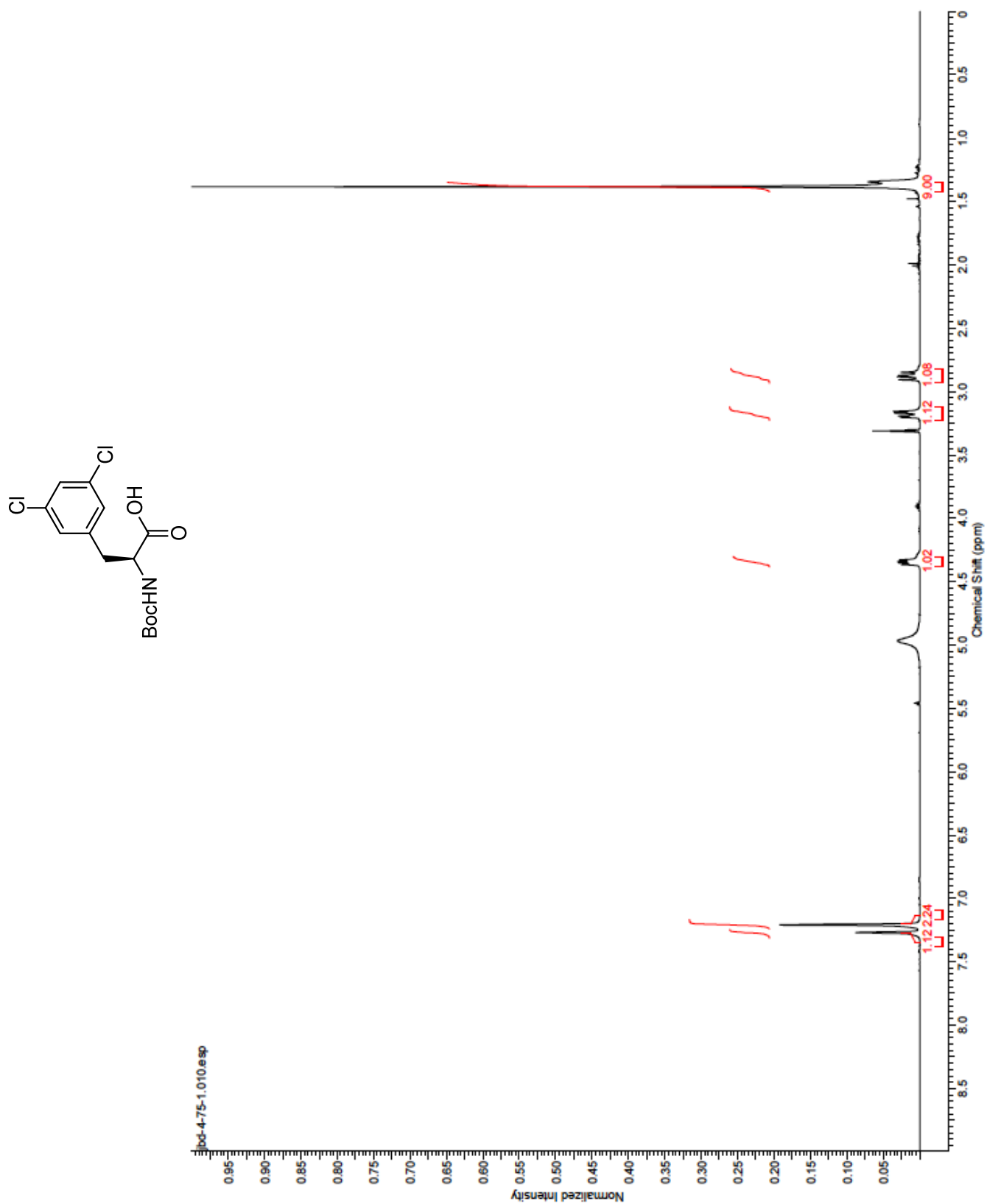
N-Methylpyridinium-Leu-Enkephalin (13)



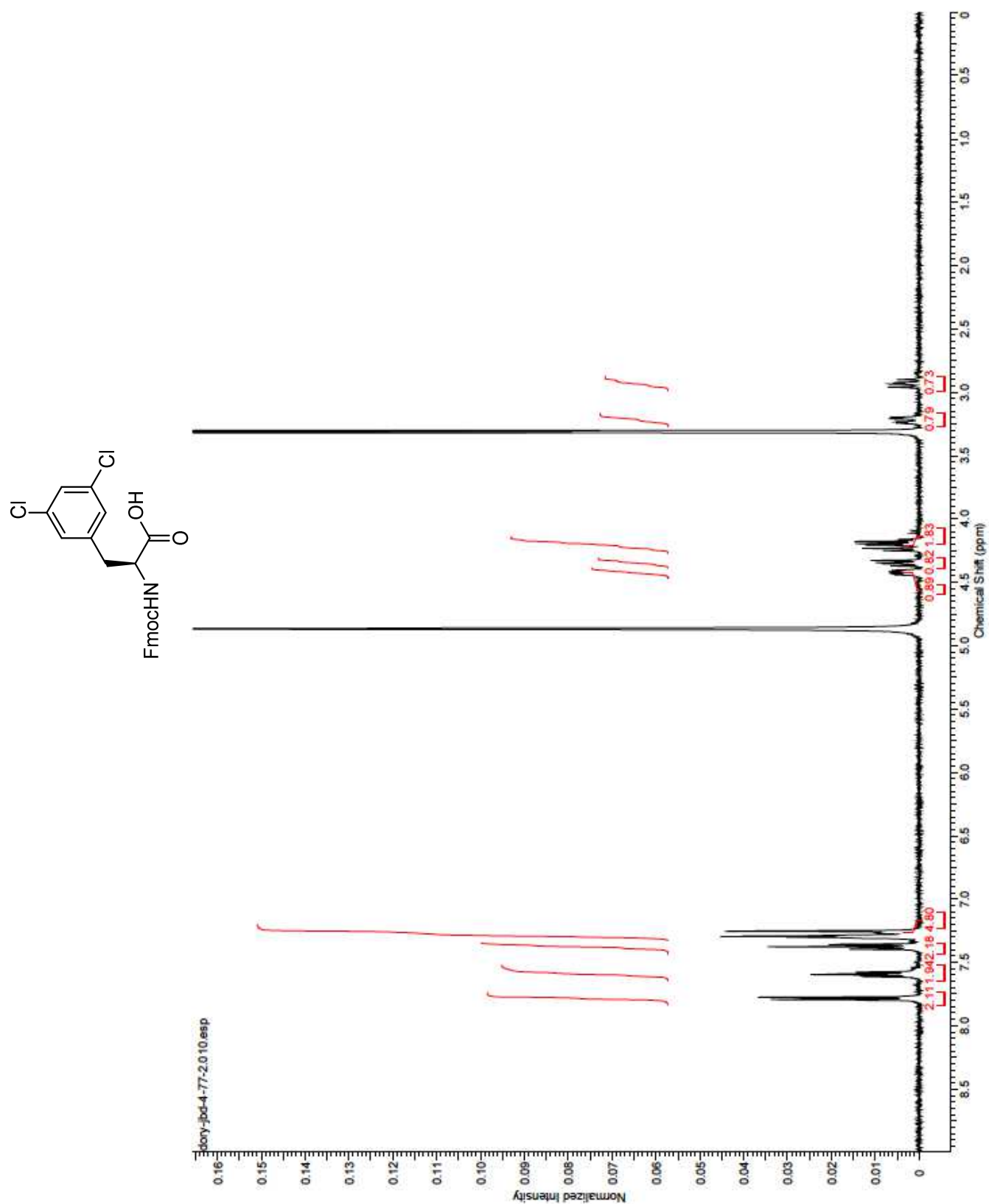
(S)-methyl 2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-3-(3,5-dichlorophenyl)propanoate (19)



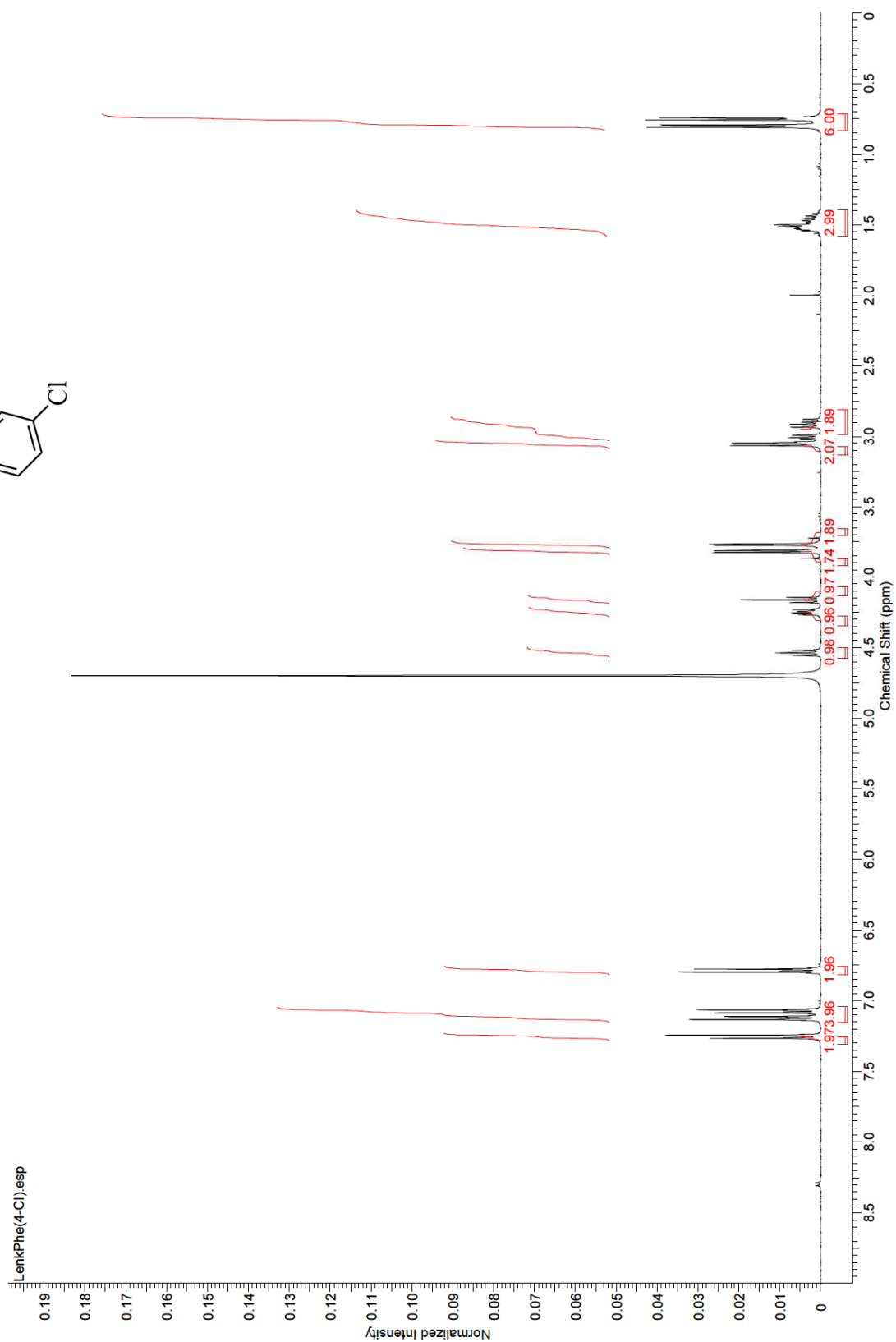
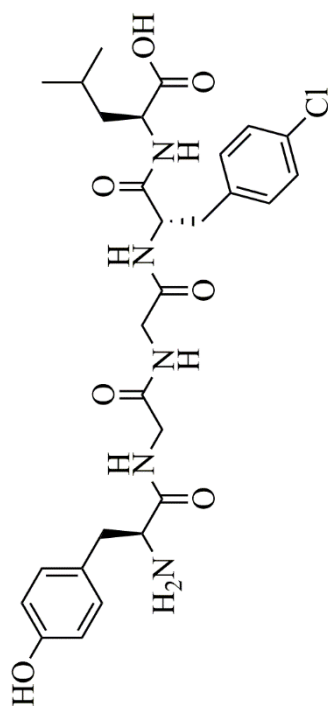
(S)-2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-3-(3,5-dichlorophenyl)propanoic acid (20)



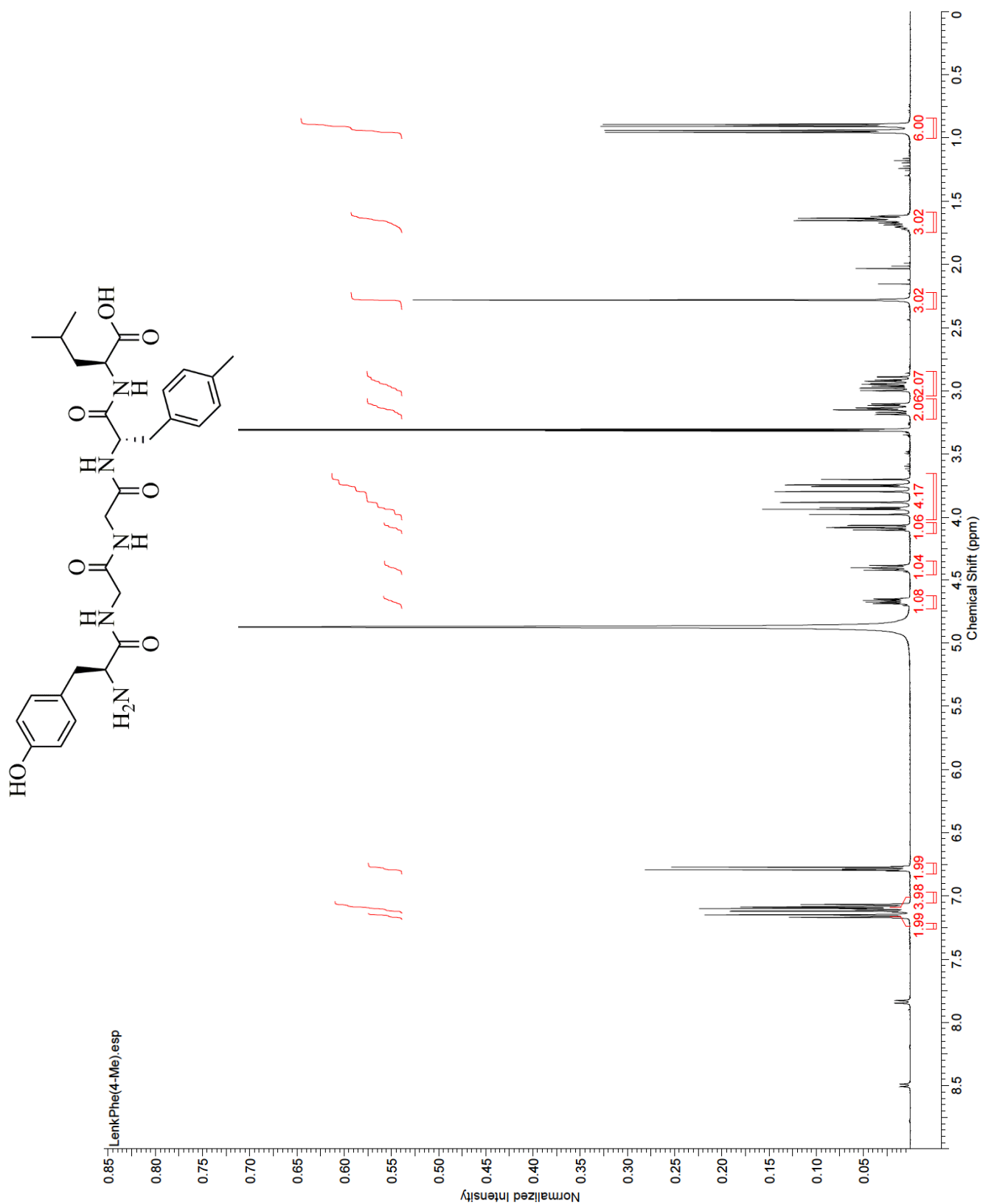
2-((((9H-fluoren-9-yl)methoxy)carbonyl)amino)-3-(3,5-dichlorophenyl)propanoic acid (21)



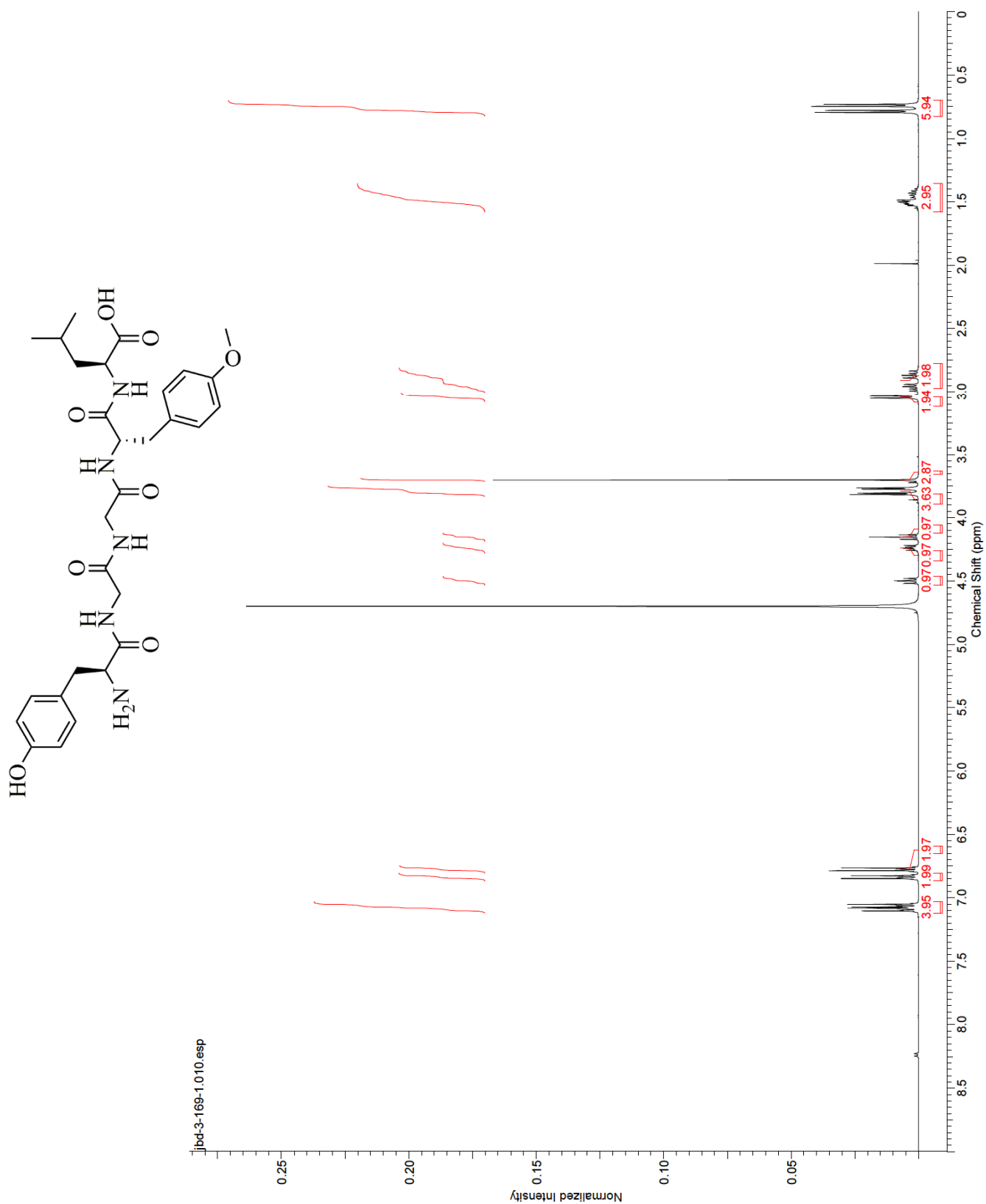
H-Tyr-Gly-Gly-Phe(4-Cl)-Leu-OH (22)



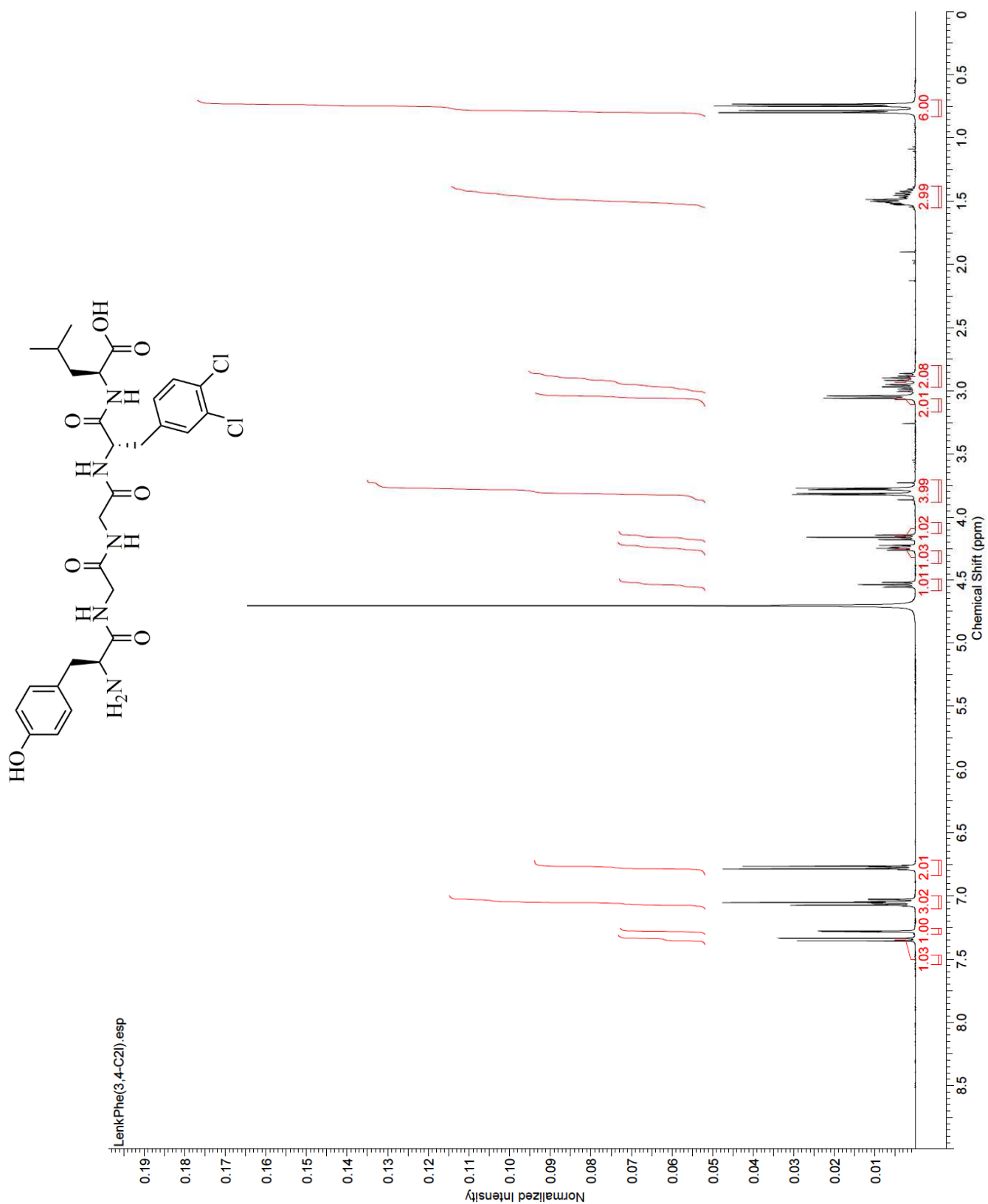
H-Tyr-Gly-Gly-Phe(4-Me)-Leu-OH (23)



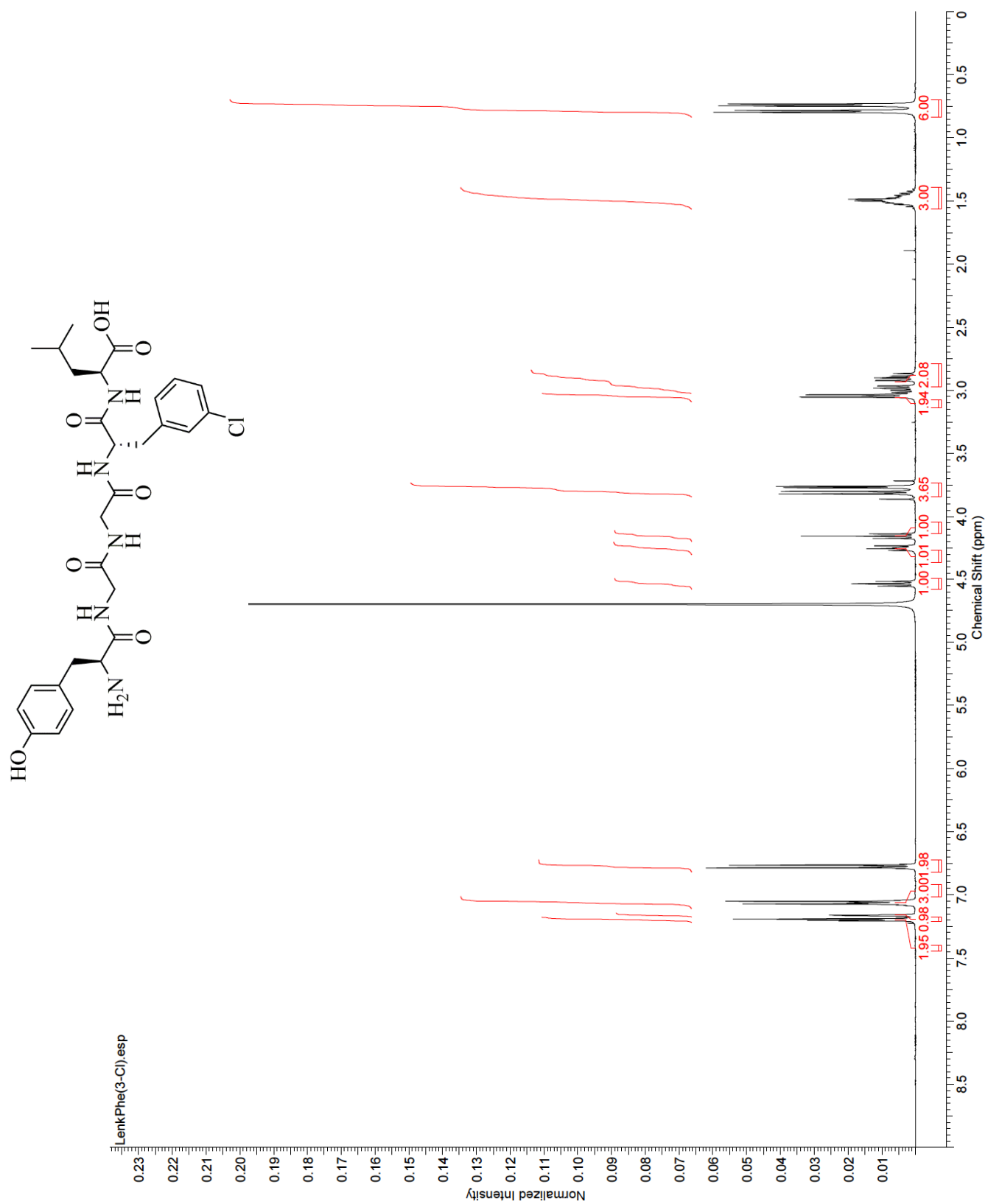
H-Tyr-Gly-Gly-Phe(4-OMe)-Leu-OH (24)



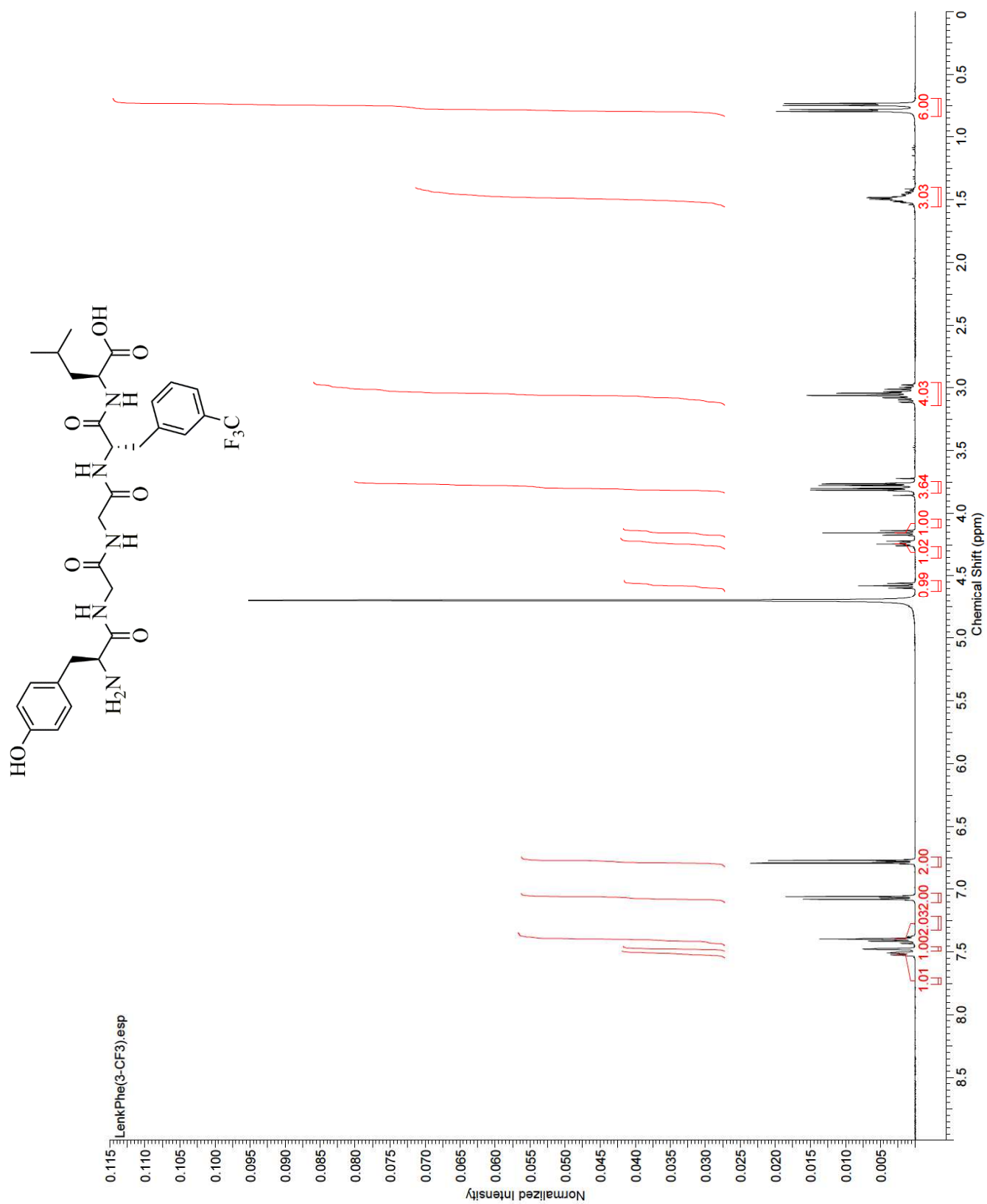
H-Tyr-Gly-Gly-Phe(3,4-Cl₂)-Leu-OH (25)



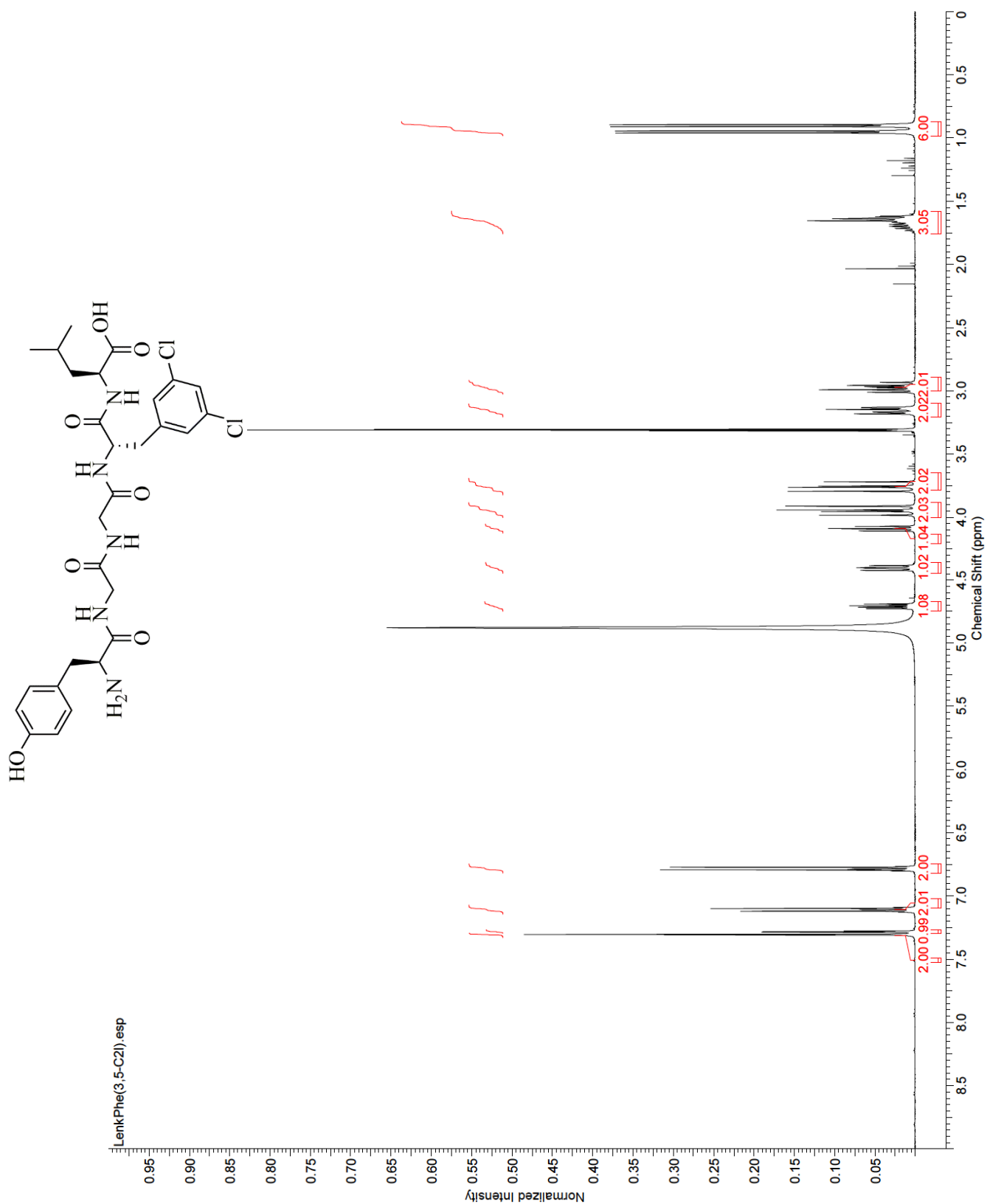
H-Tyr-Gly-Gly-Phe(3-Cl)-Leu-OH (26)



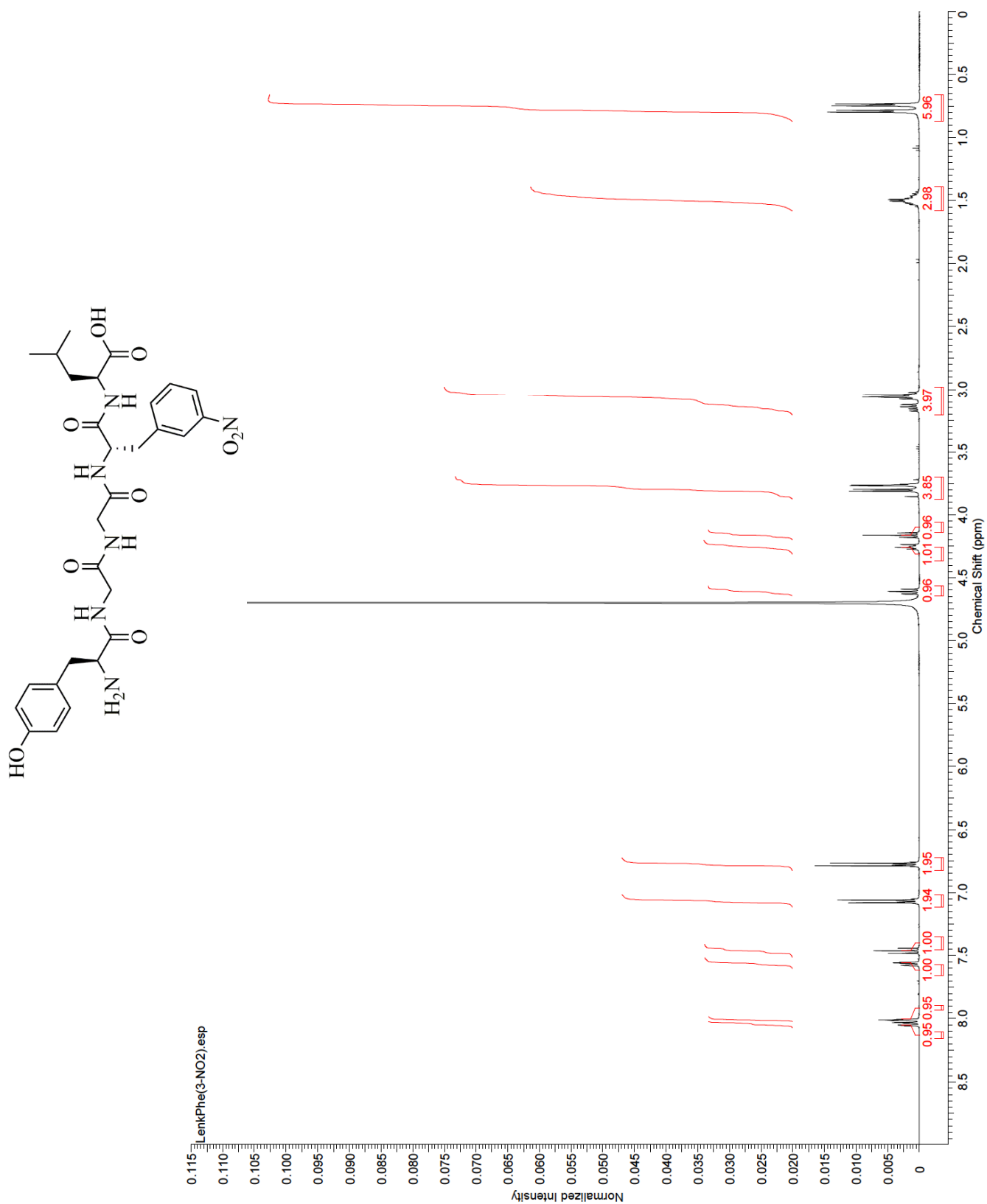
H-Tyr-Gly-Gly-Phe(3-CF₃)-Leu-OH (27)



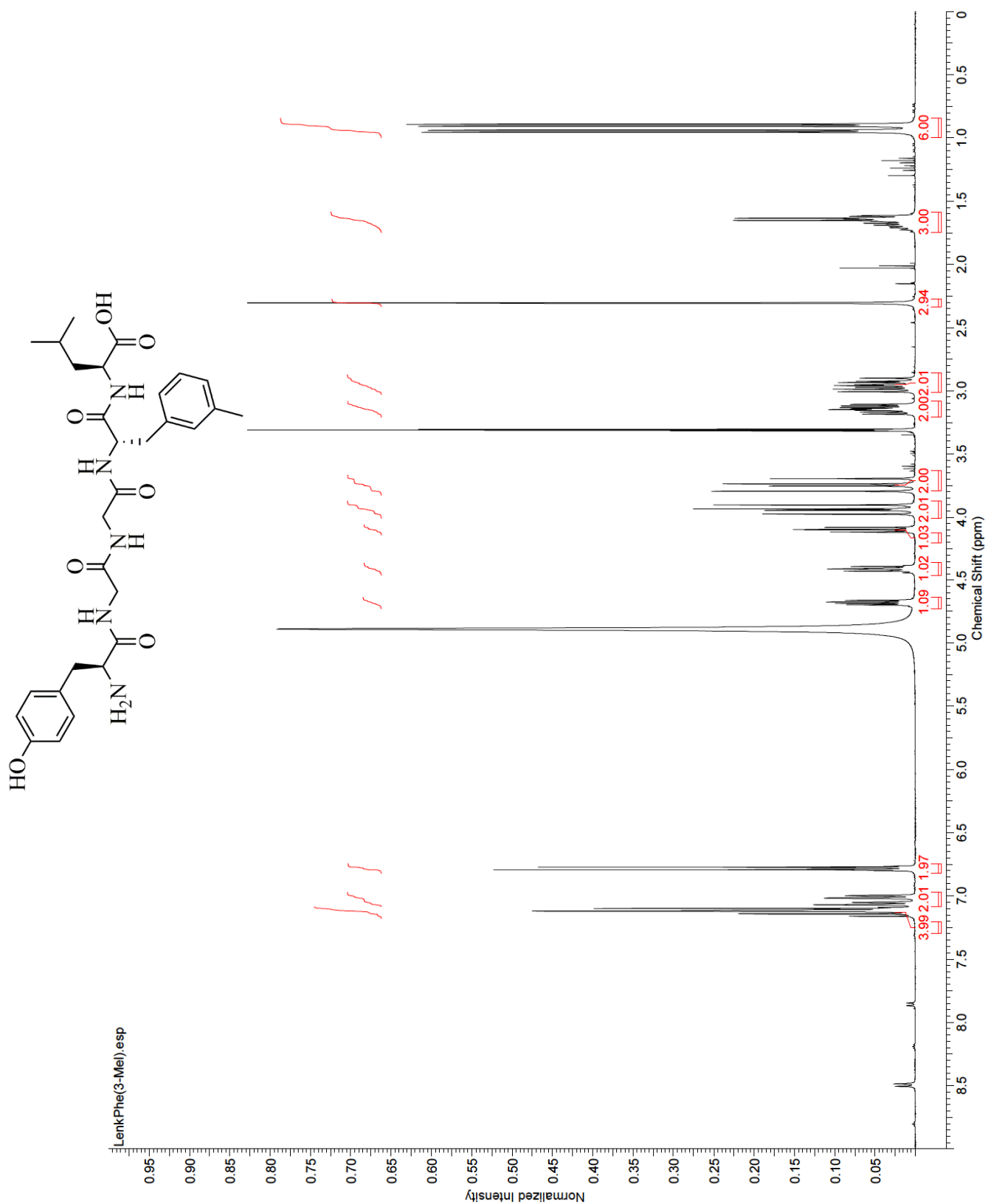
H-Tyr-Gly-Gly-Phe(3,5-Cl₂)-Leu-OH (29)



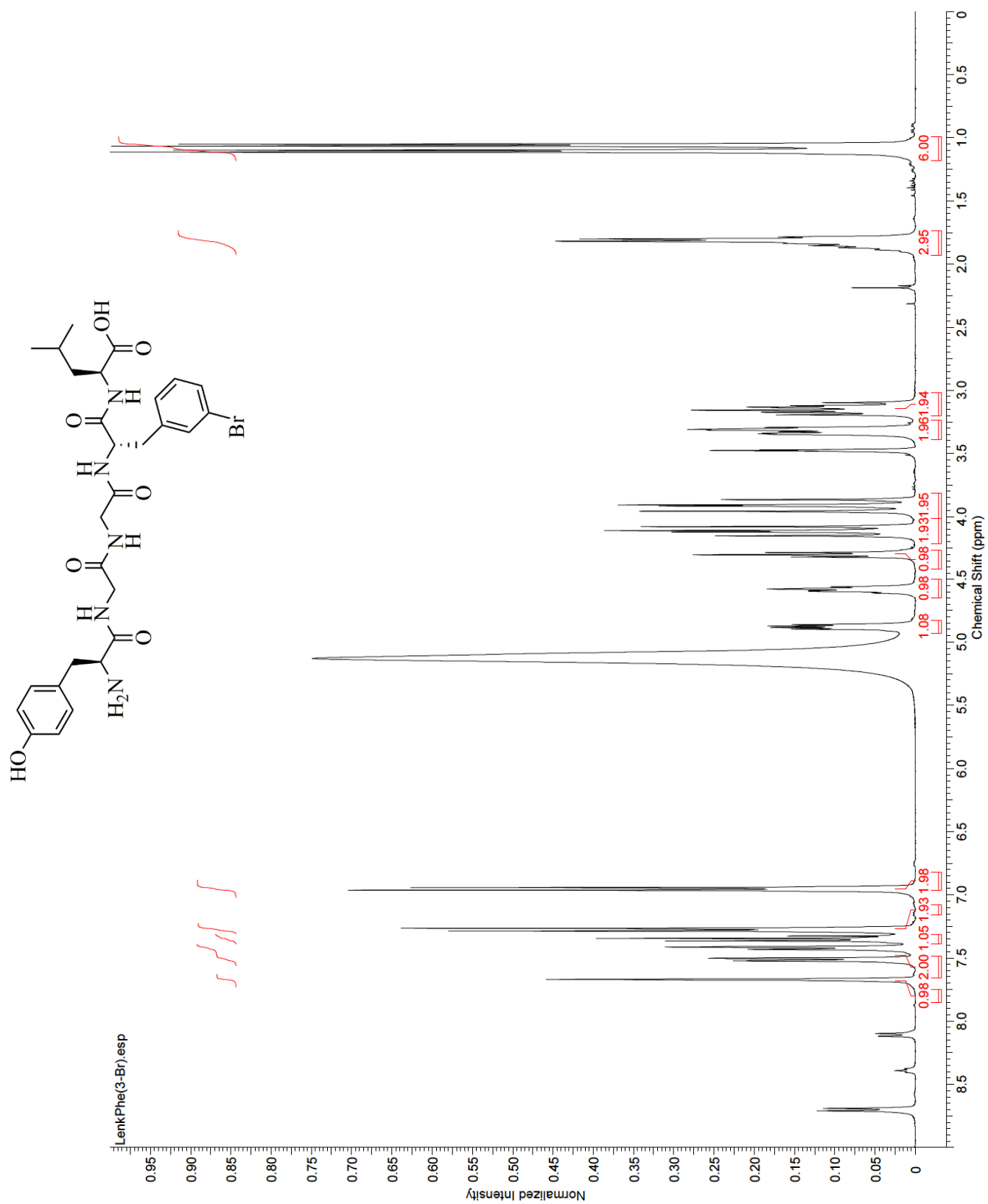
H-Tyr-Gly-Gly-Phe(3-NO₂)-Leu-OH (28)



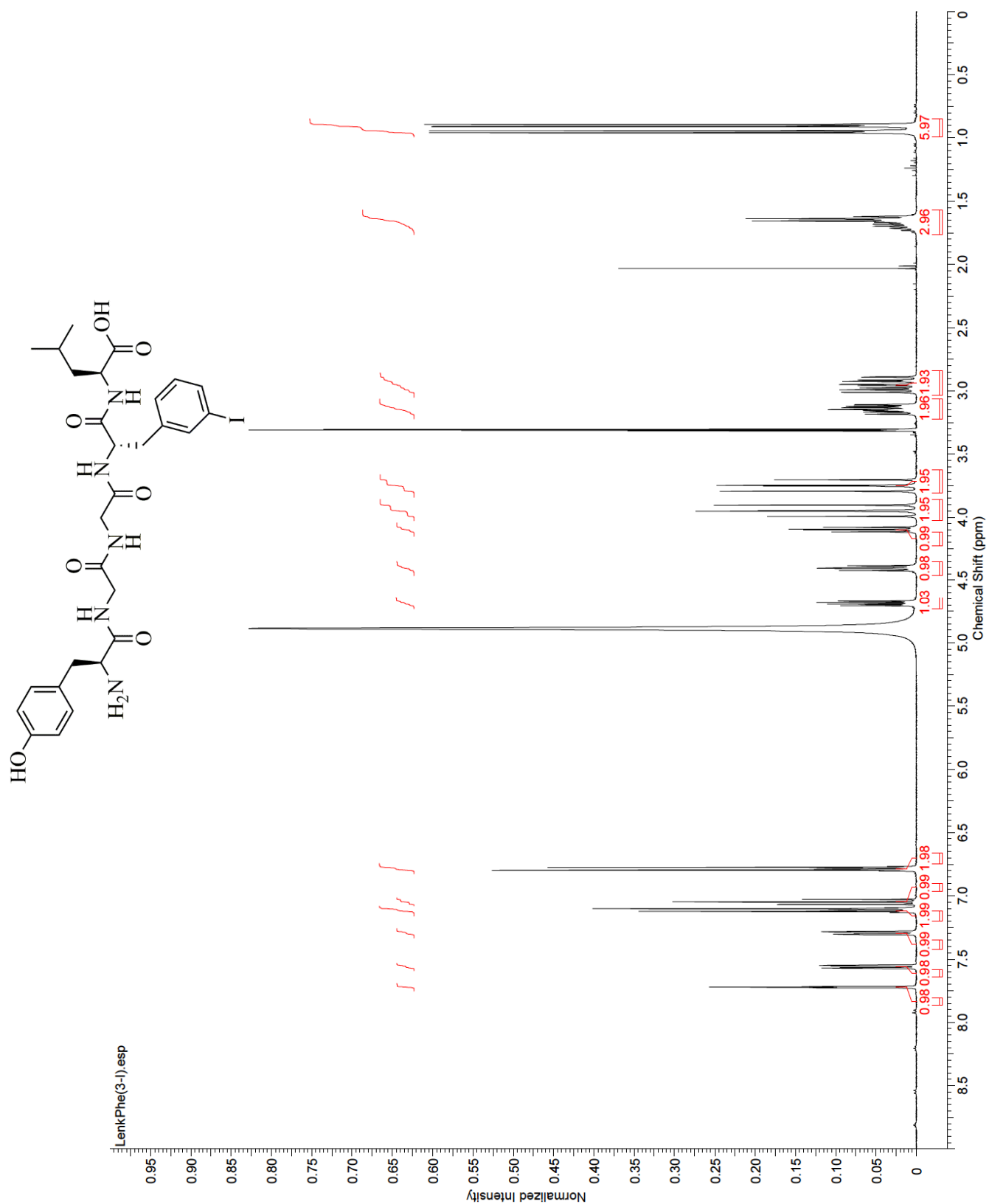
H-Tyr-Gly-Gly-Phe(3-Me)-Leu-OH (32)



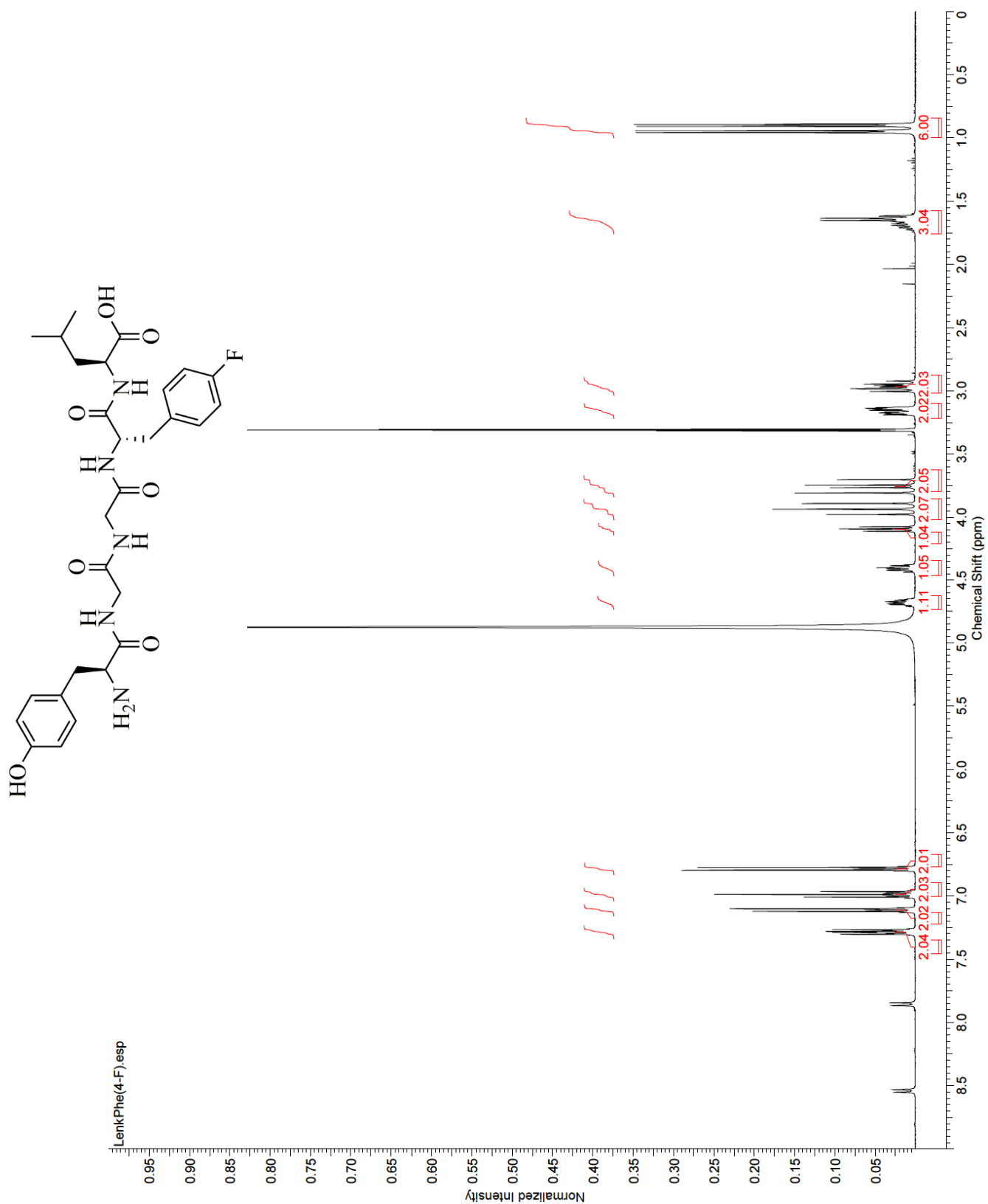
H-Tyr-Gly-Gly-Phe(3-Br)-Leu-OH (30)



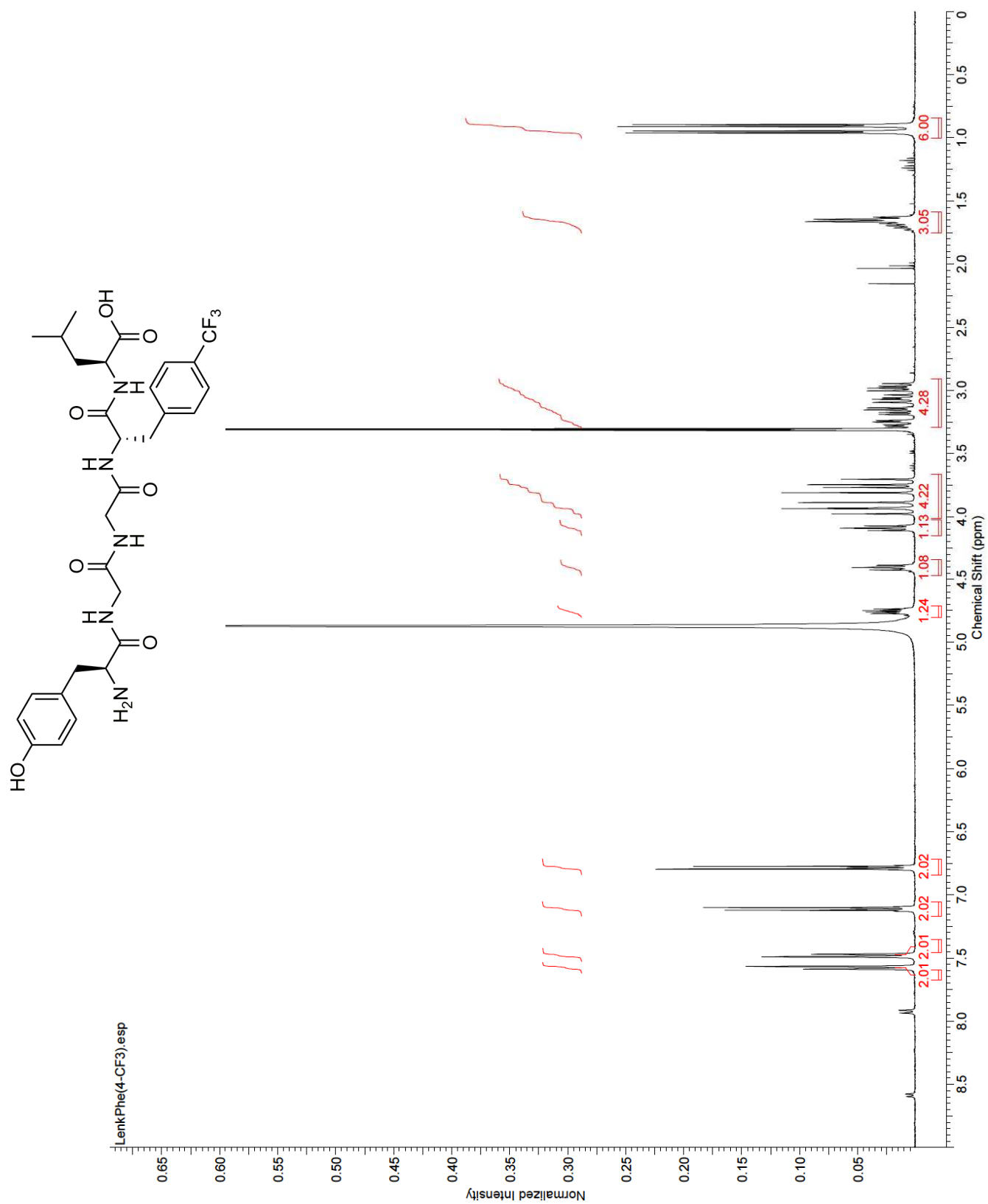
H-Tyr-Gly-Gly-Phe(3-I)-Leu-OH (31)



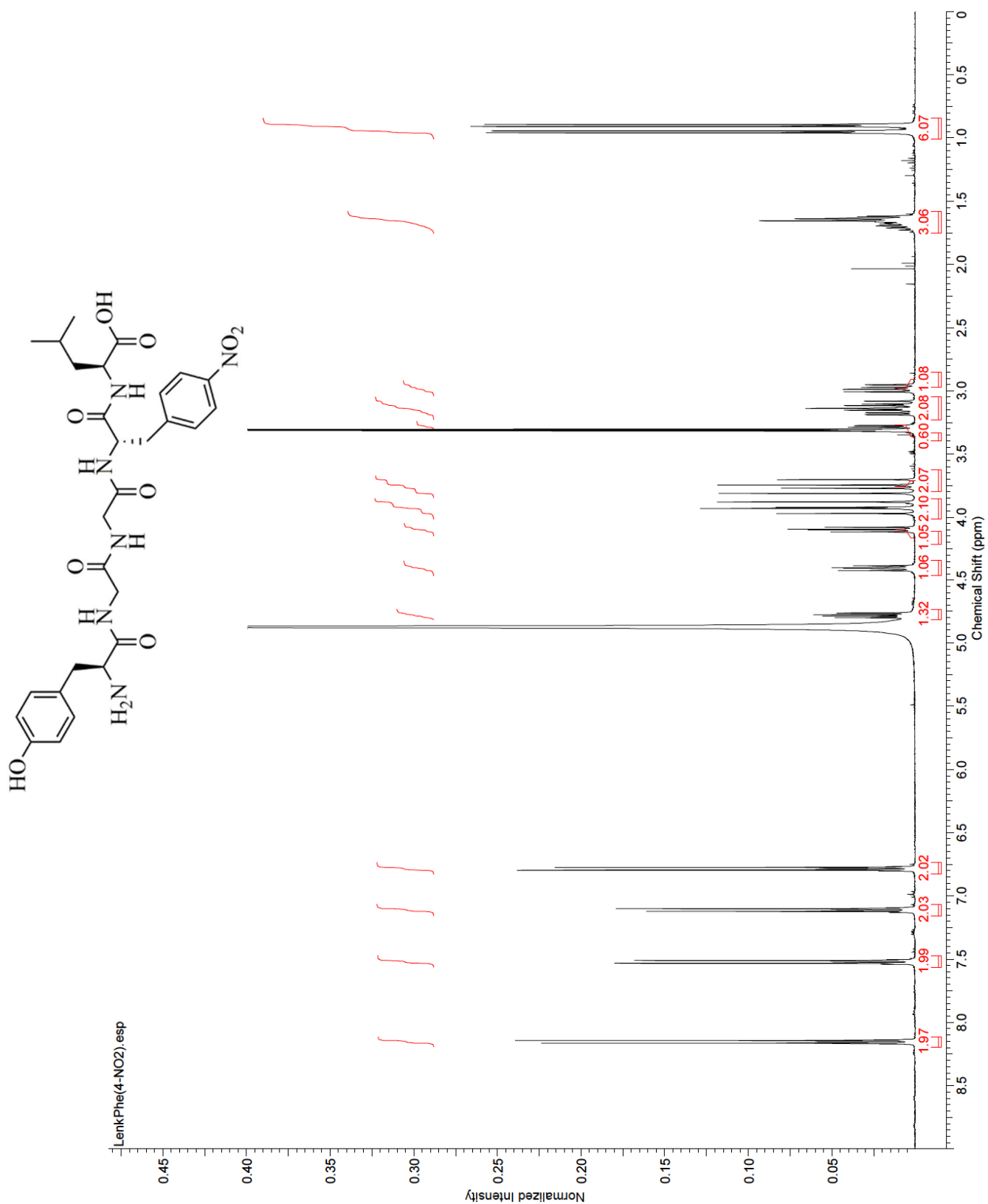
H-Tyr-Gly-Gly-Phe(4-F)-Leu-OH (33)



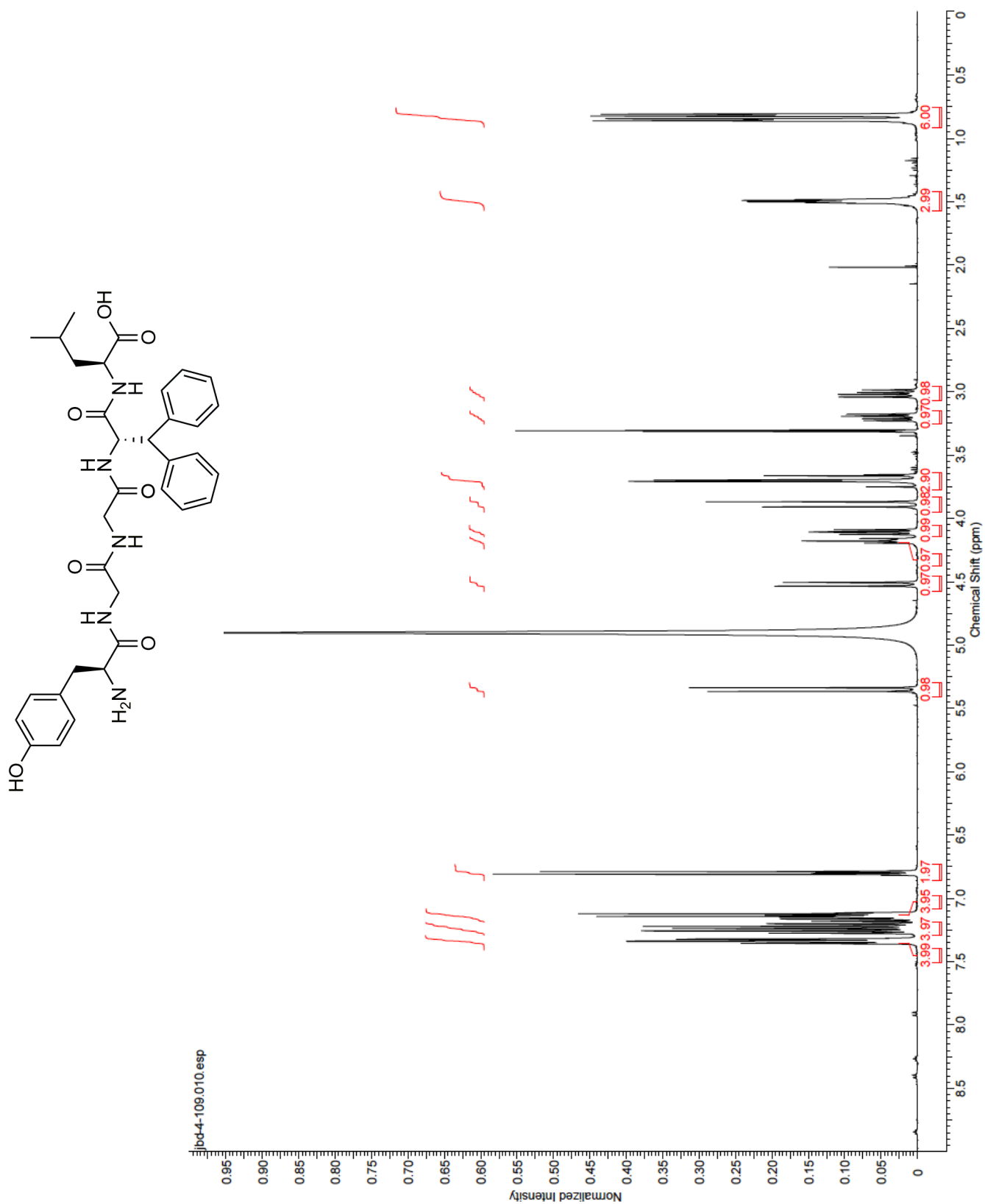
H-Tyr-Gly-Gly-Phe(4-CF₃)-Leu-OH (34)

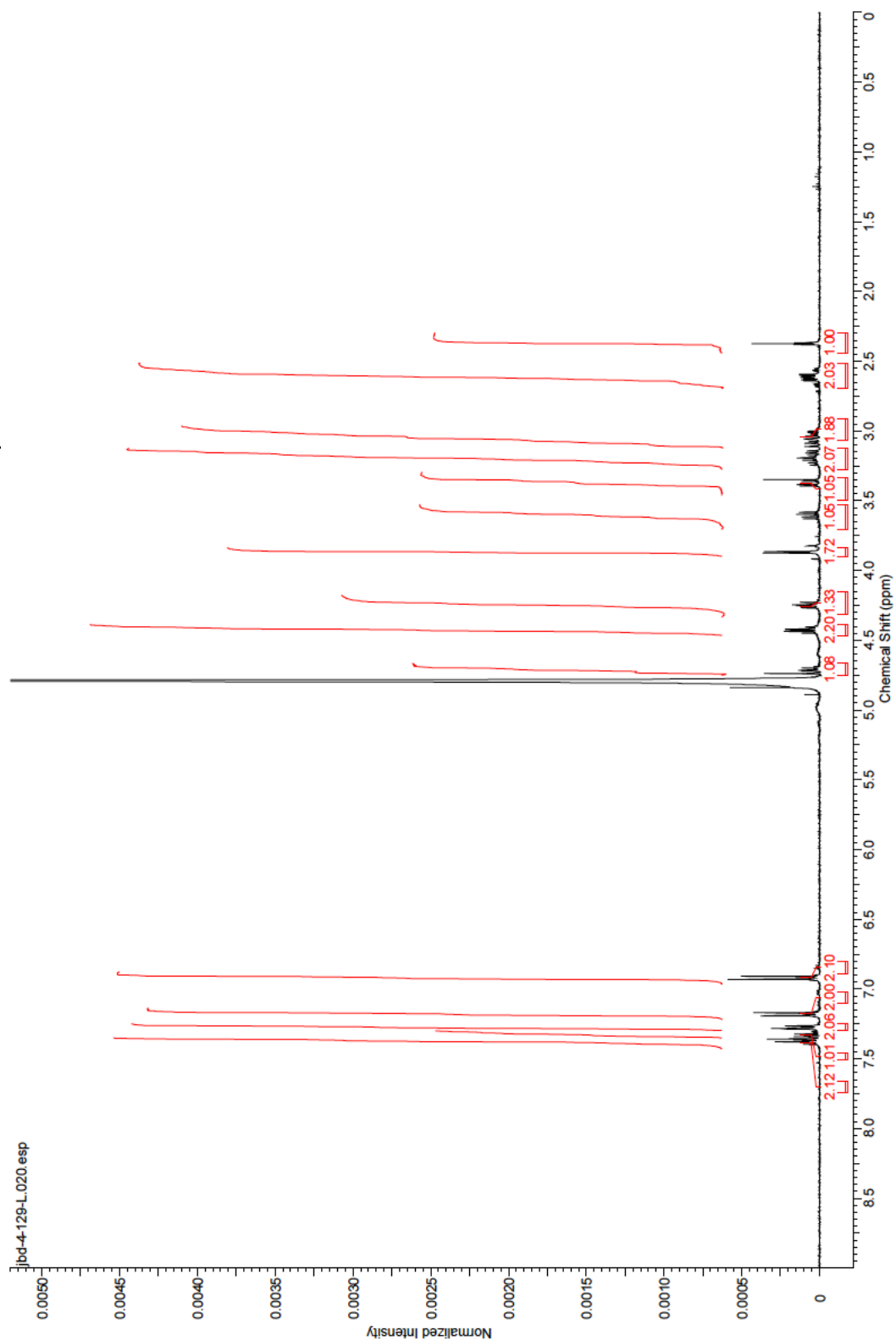


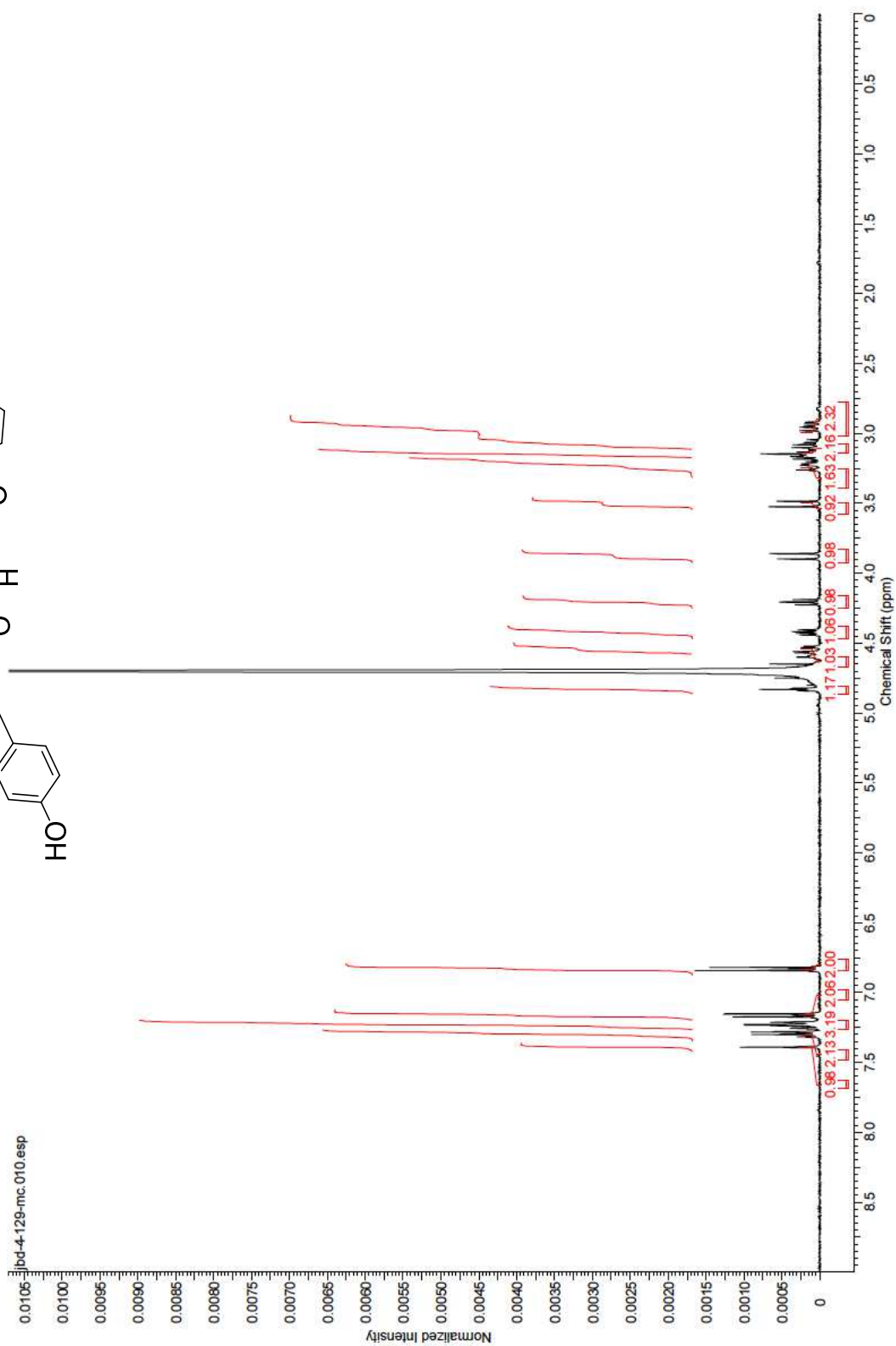
H-Tyr-Gly)-Gly-Phe(4-NO₂)-Leu-OH (35)



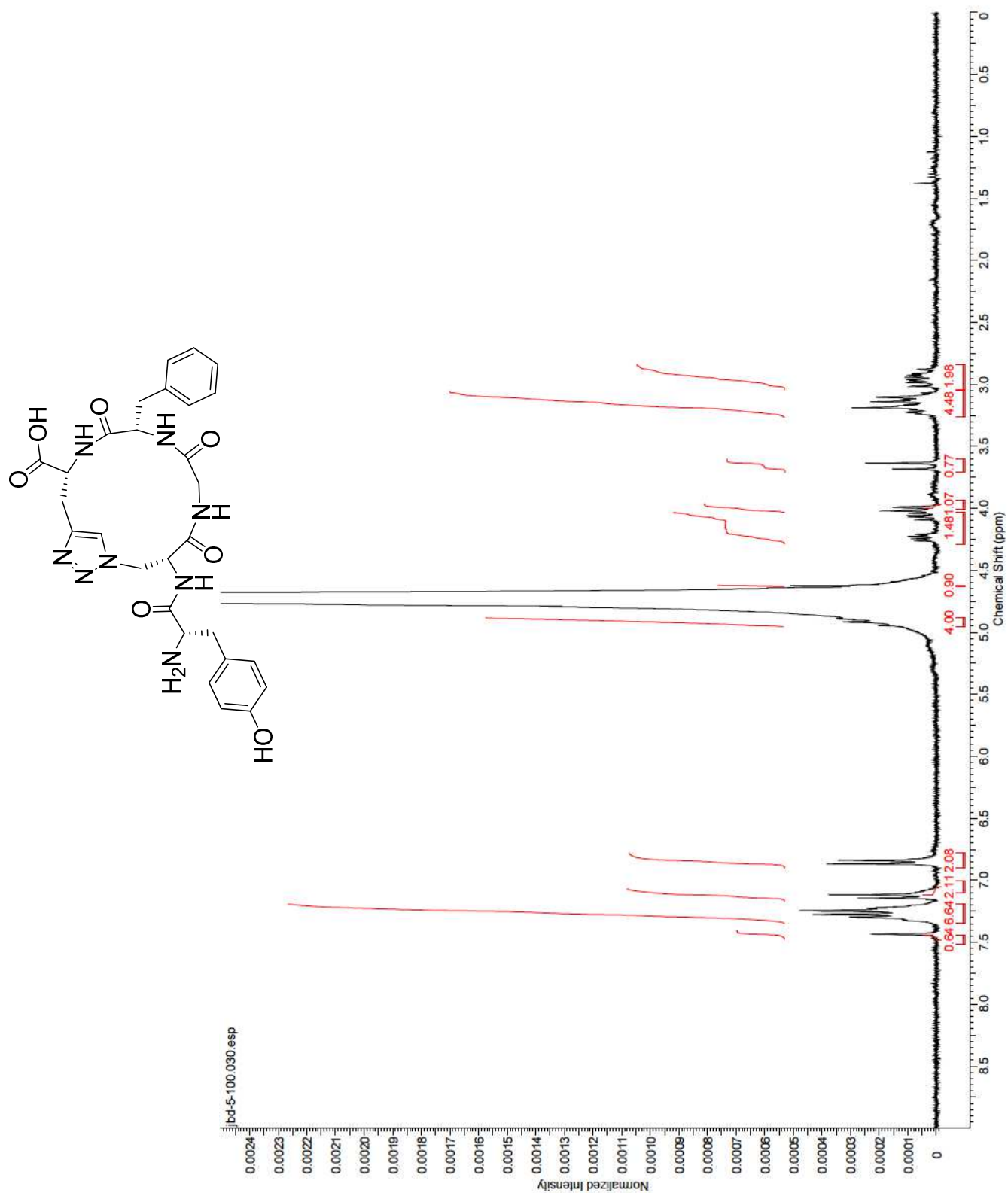
H-Tyr-Gly-Gly-Phe(β -Phe)-Leu-OH (36)



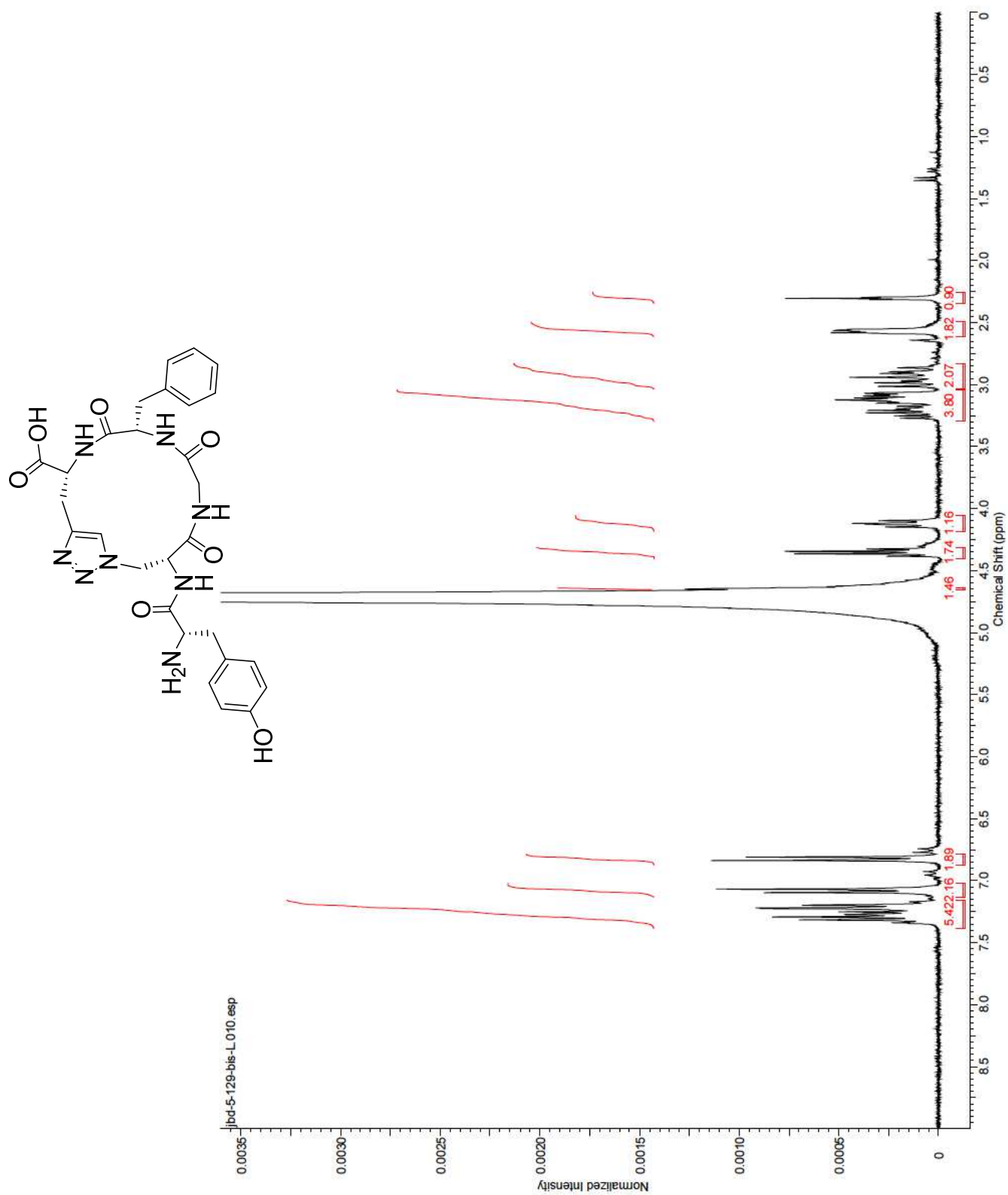
N#CC[C@H](C(=O)N[C@@H](Cc1ccccc1)C(=O)N[C@@H](C#C)C(=O)O)[C@H](C(=O)N[C@@H](Cc2ccc(O)cc2)C)C(=O)N[C@@H](C#N)C(=O)N[C@@H](Cc3ccccc3)C(=O)O



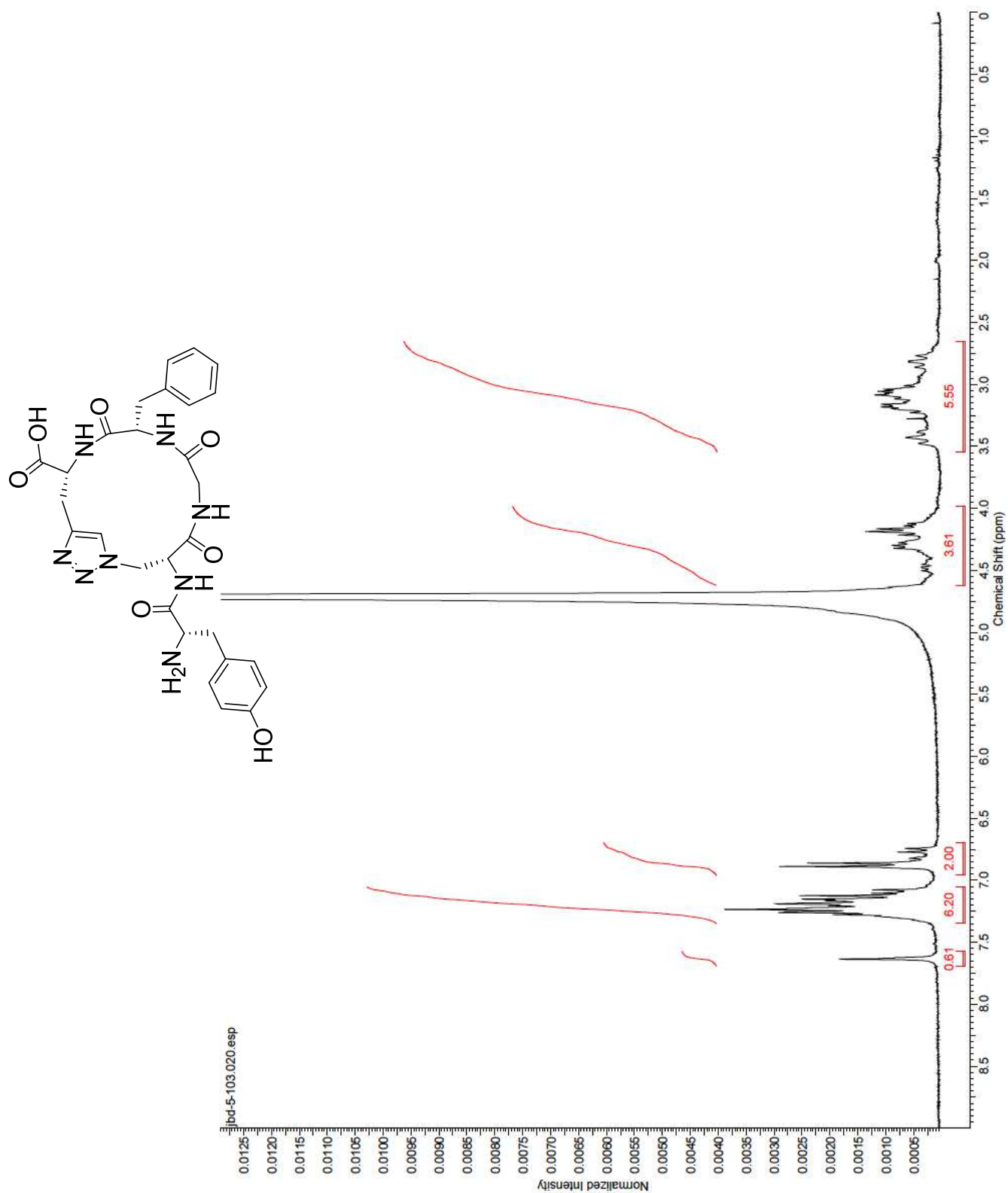
H-Tyr-c[D-Dpa(N₃)-Gly-Phe-D-Pra]-OH (1,5-triazole) (42).



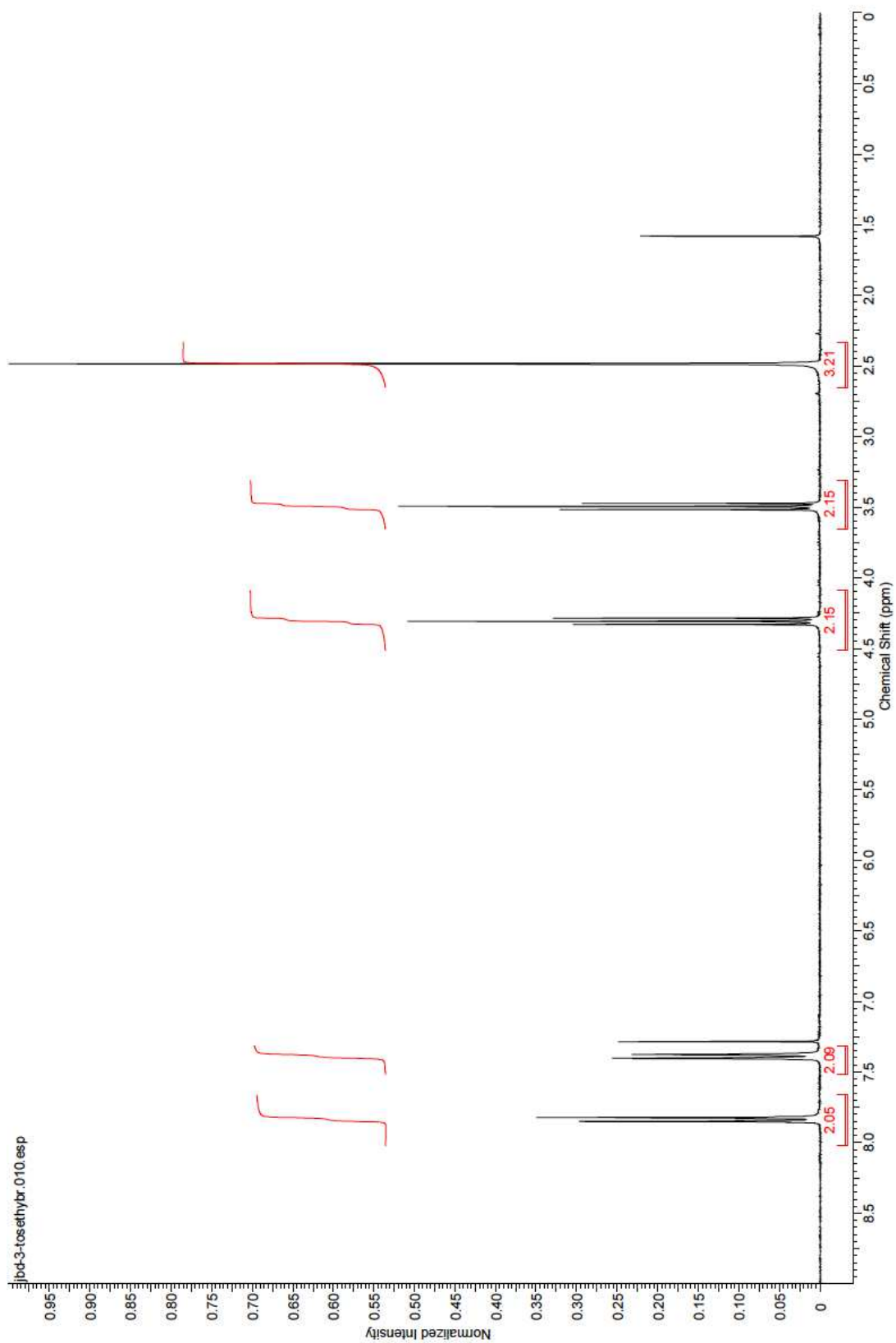
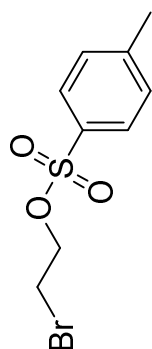
H-Tyr-D-Dpa(N₃)-Phe-D-Pra-OH (1,4-triazole) (43).



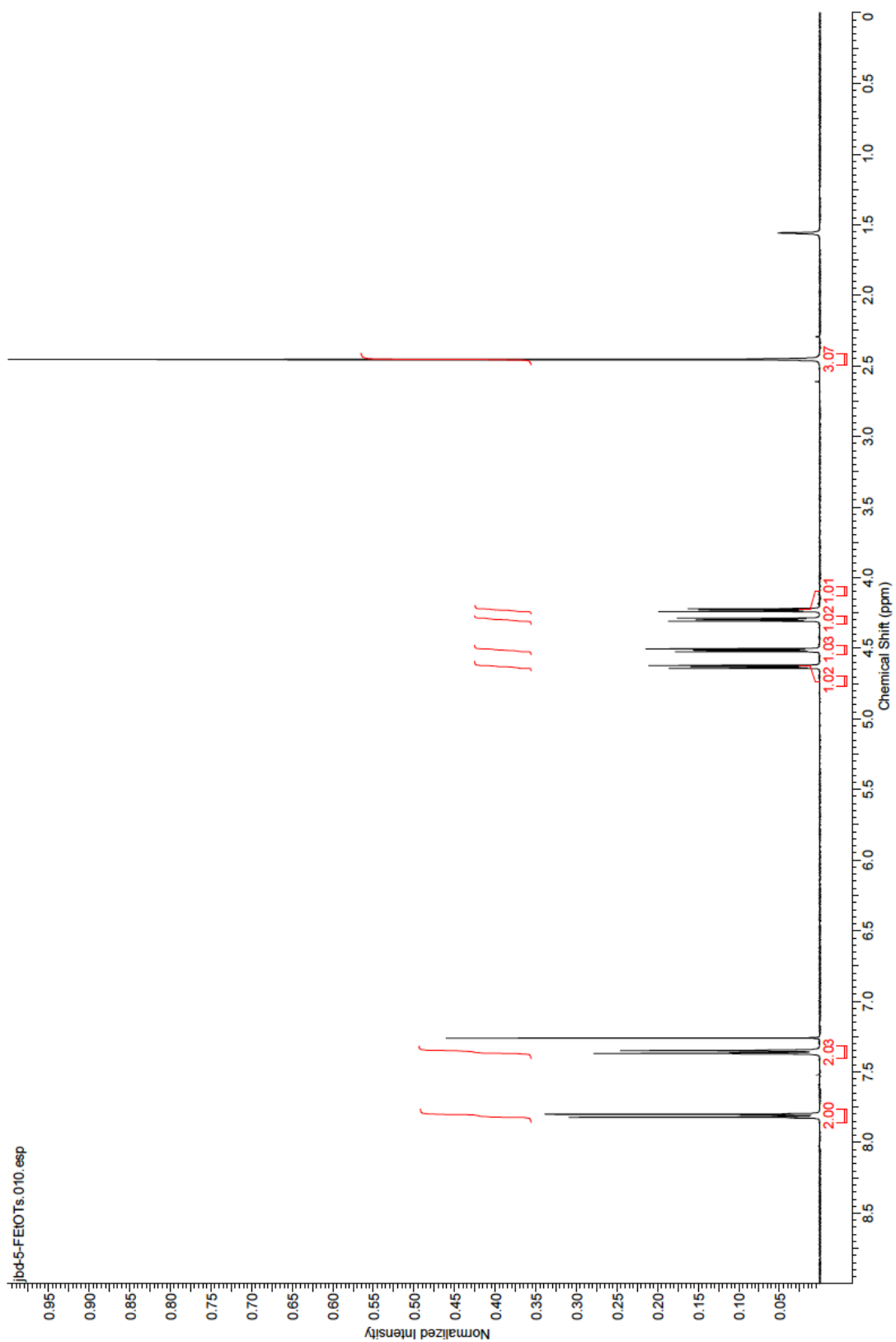
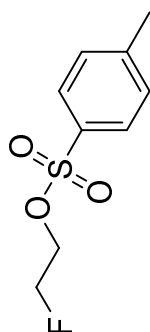
H-Tyr-c[D-Dpa(N₃)-Phe-D-Pra]-OH (1,5-triazole) (45).



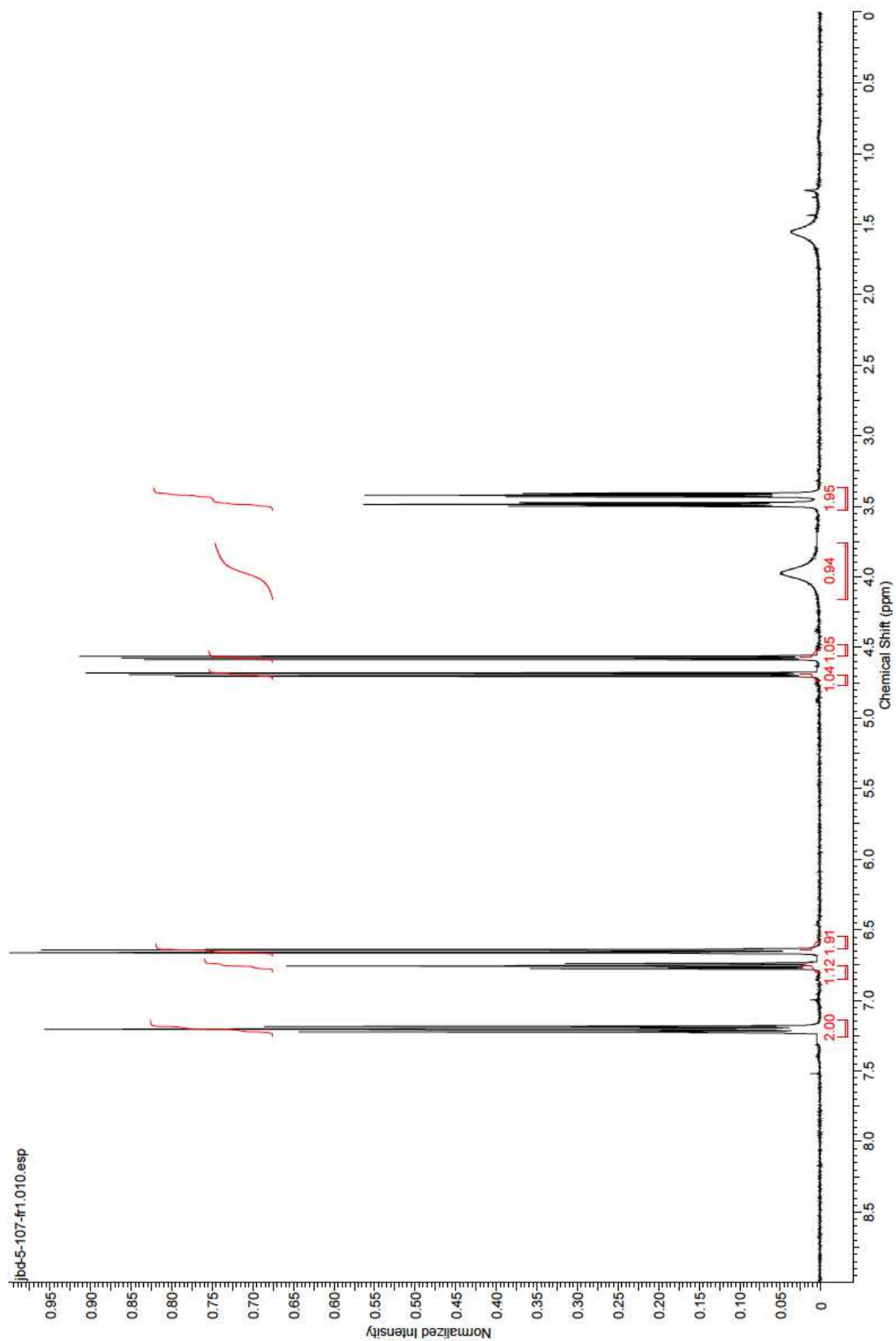
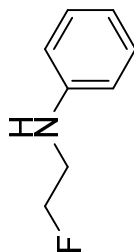
2-bromoethyl 4-methylbenzenesulfonate (61)



2-Fluoroethyl 4-methylbenzenesulfonate (68).



***N*-(2-fluoroethyl)aniline (69)**



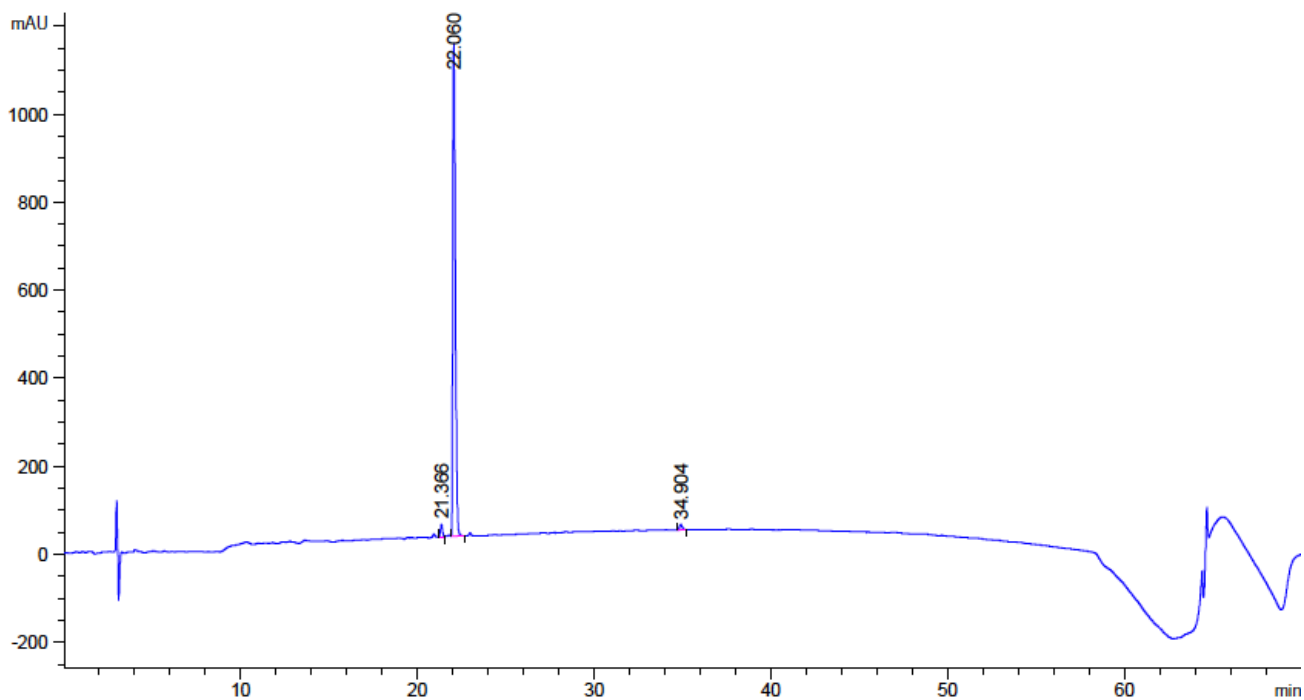
ANNEXE 3 : SPECTRES DE CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE A HAUTE PERFORMANCE DES
PEPTIDES SYNTHÉTISÉS

La pureté de toutes les fractions a été analysée en utilisant une HPLC analytique Agilent 1100 series, détection à 210 nm, avec une colonne Agilent Eclipse XDB 5 μ m 4.6.0 x 100 mm C18 et un gradient d'acétonitrile (0,1 % TFA) dans une solution aqueuse (0,1 % TFA) (de 10 % à 70 %) en 50 min, et un débit de 1ml/min; Les chromatogrammes ont été comparés à l'injection d'un blanc afin de déterminer les impuretés. Pour les composés, la pureté était supérieure ou égale à 96 %.

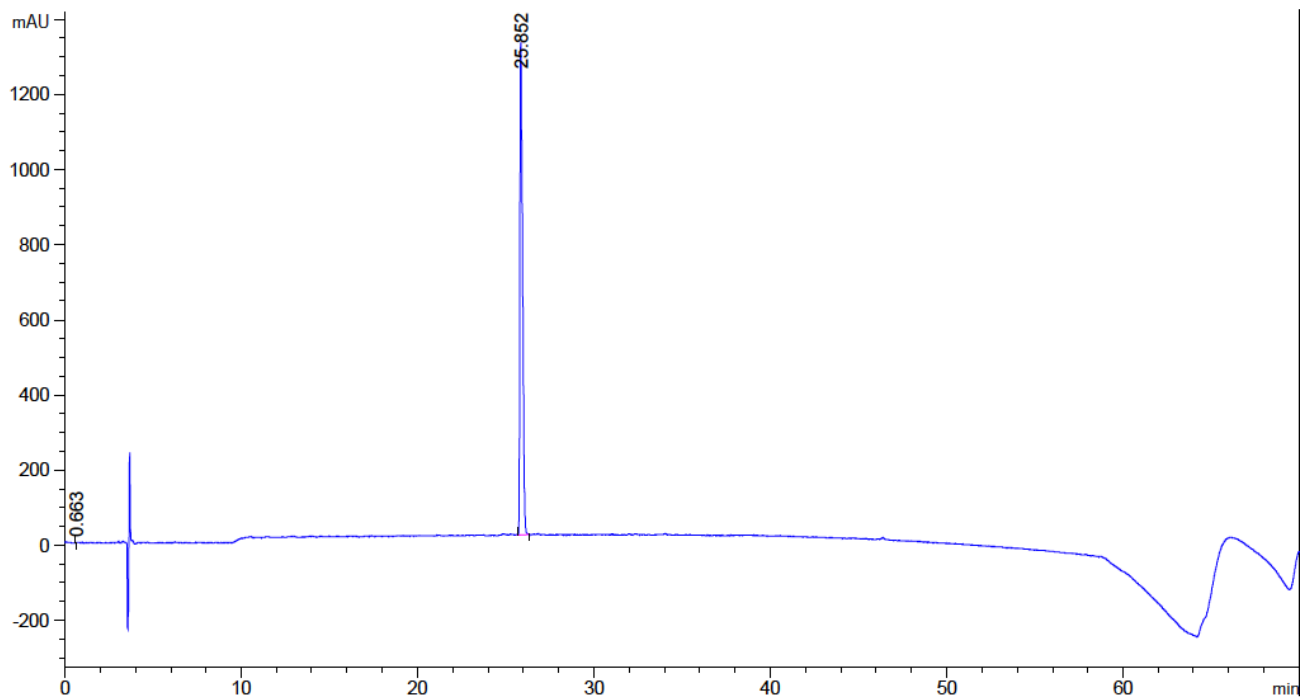
Tableau A3.1. HPLC des peptides **2-8**.

Entrée	Pureté (%)	Temps de rétention (min)
2	97	22,06
3	100	25,85
4	98	23,75
5	100	26,43
6	96	24,99
7	96	24,46
8	97	25,53

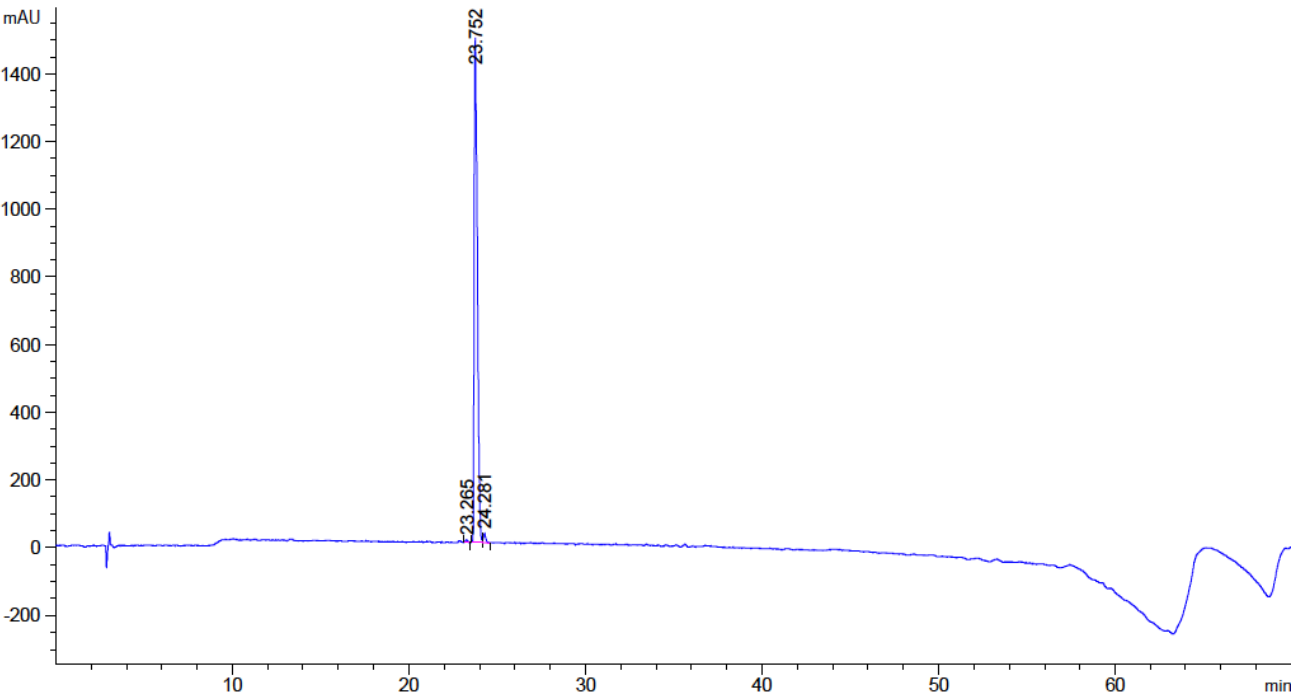
Peptide 2:



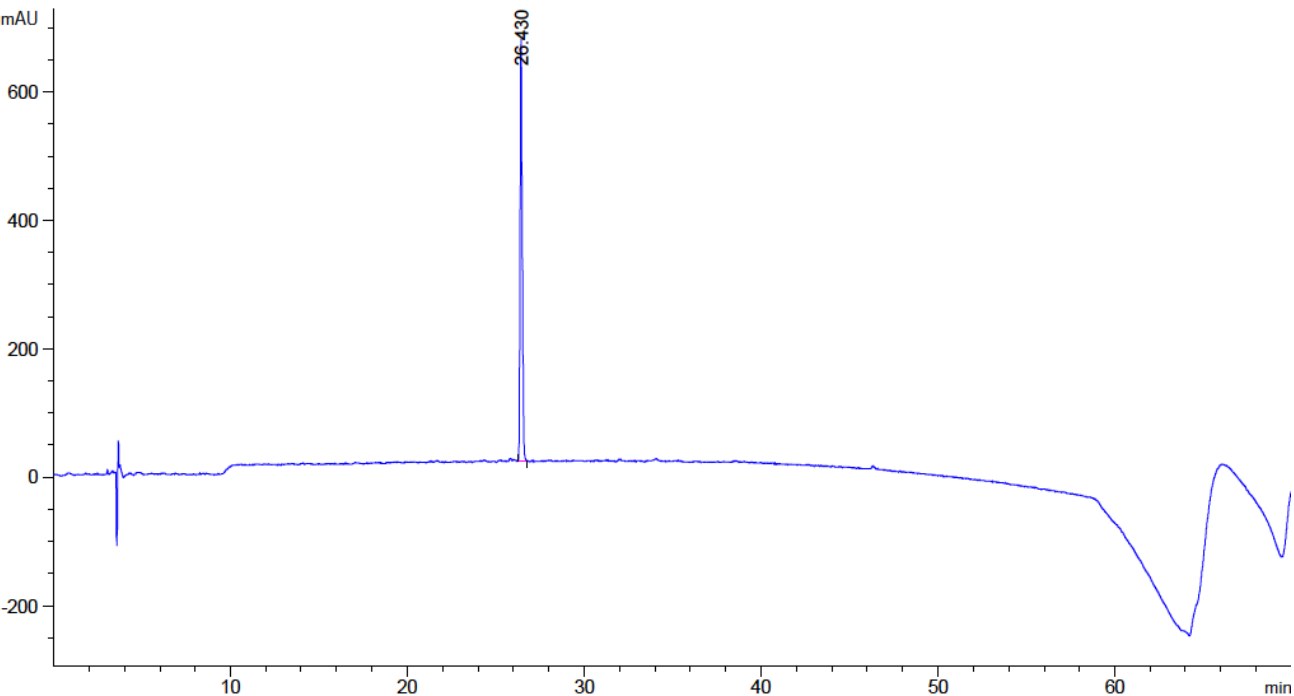
Peptide 3:



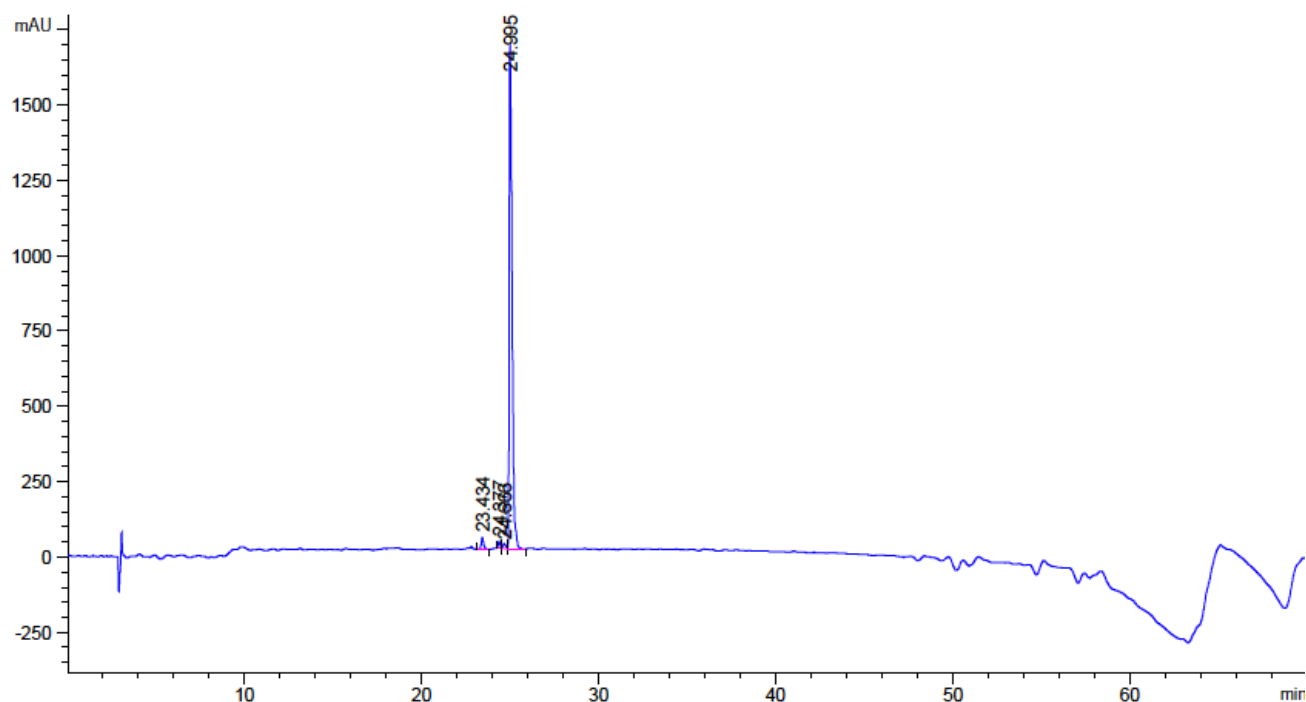
Peptide 7:



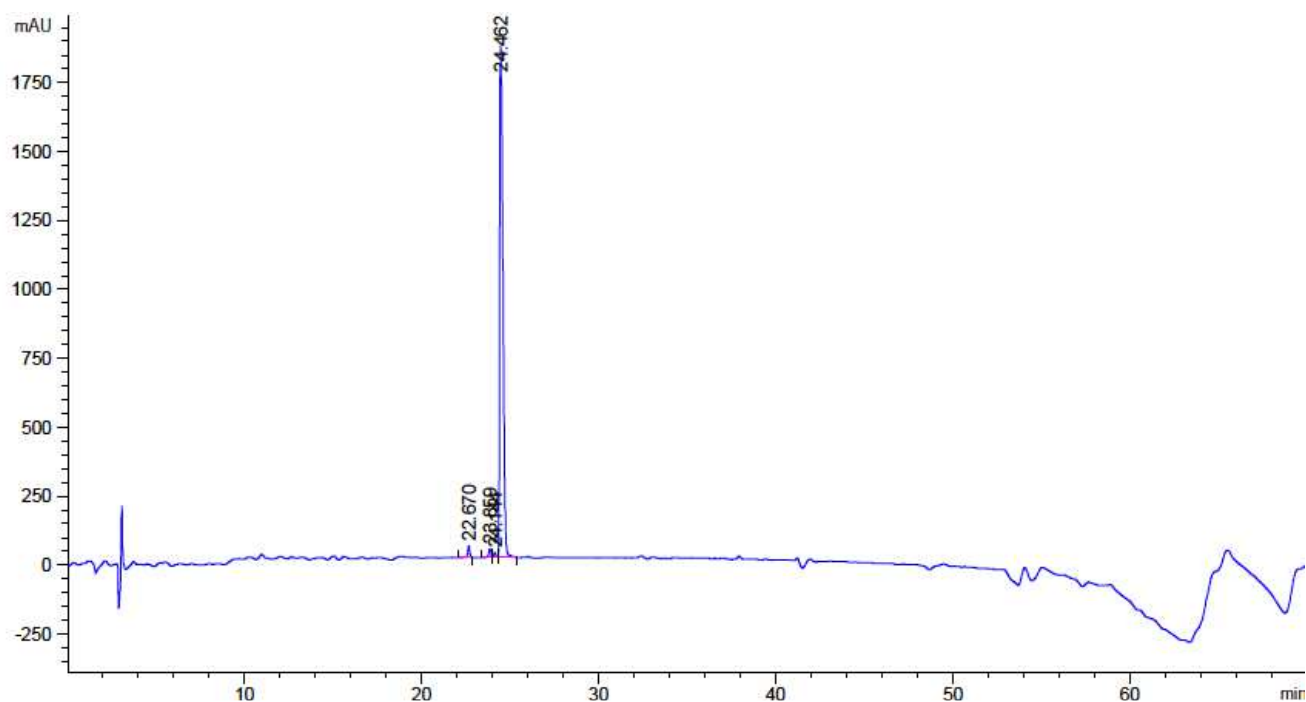
Peptide 6:



Peptide 4:



Peptide 5:



Peptide 8:

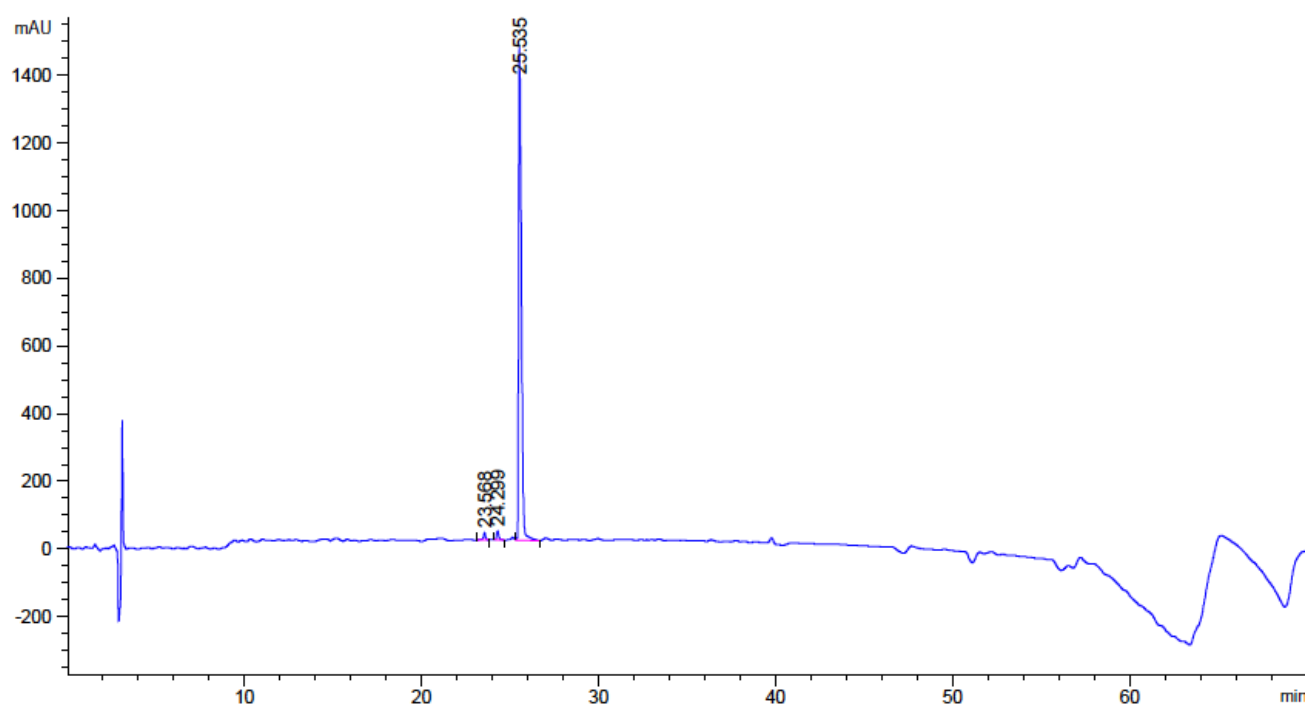
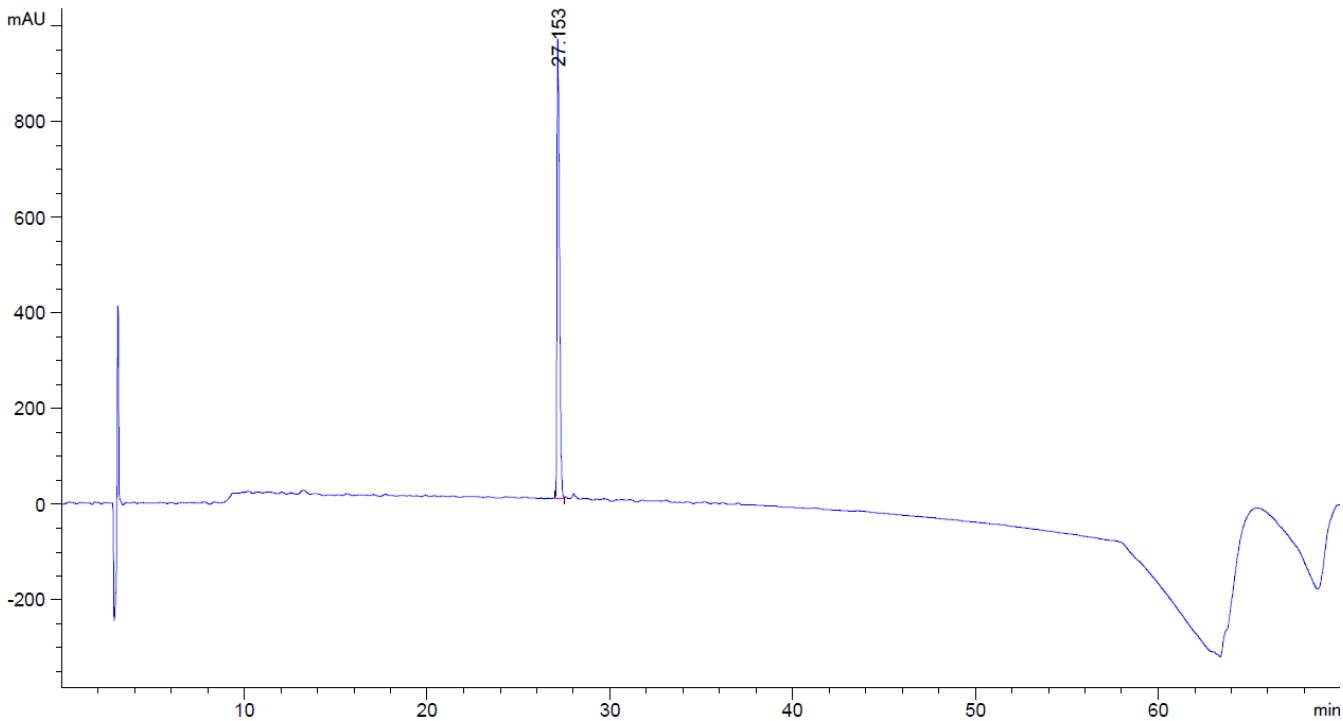


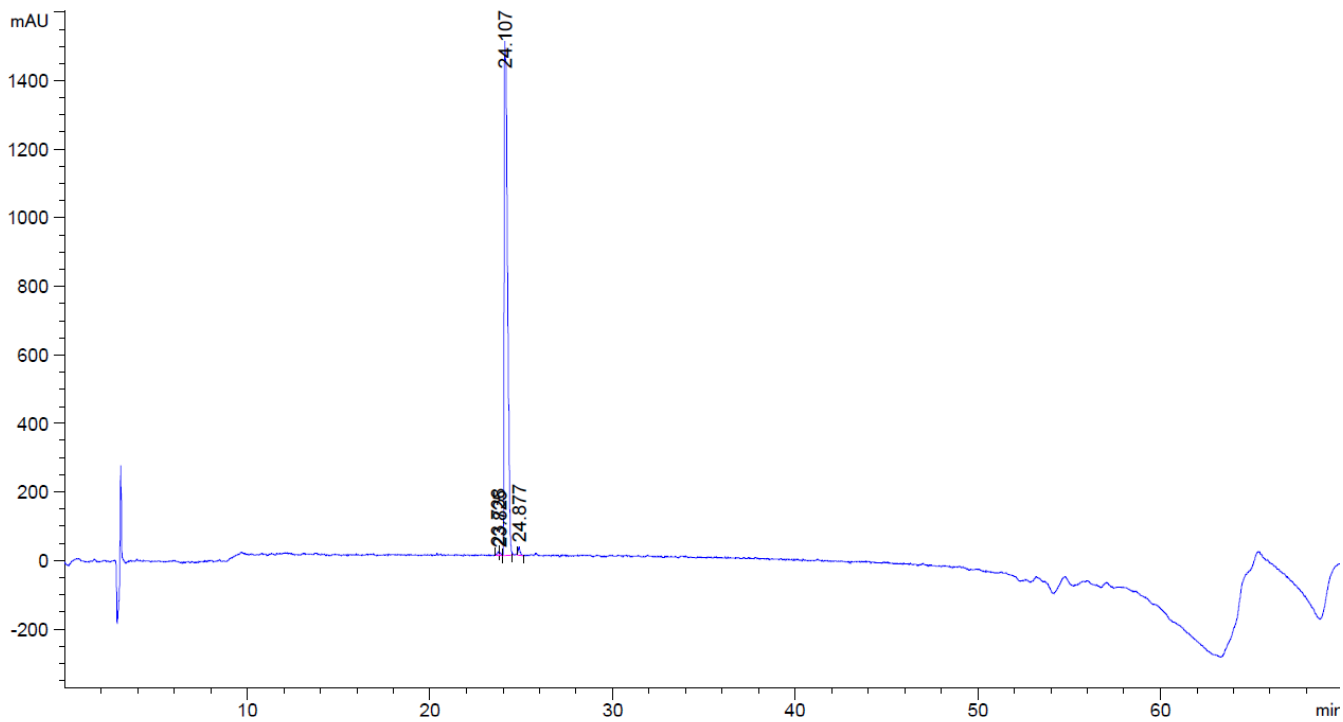
Tableau A3.2. HPLC des peptides **22-36**.

Entrée	Pureté (%)	Temps de rétention (min)
22	100 %	27,15
23	100 %	25,27
24	98 %	24,11
25	99 %	29,68
26	98 %	26,70
27	99 %	28,41
28	97 %	24,84
29	100 %	29,45
30	98 %	27,02
31	100 %	27,90
32	99 %	25,55
33	99 %	24,01
34	99 %	28,41
35	98 %	24,06
36	99 %	28,46

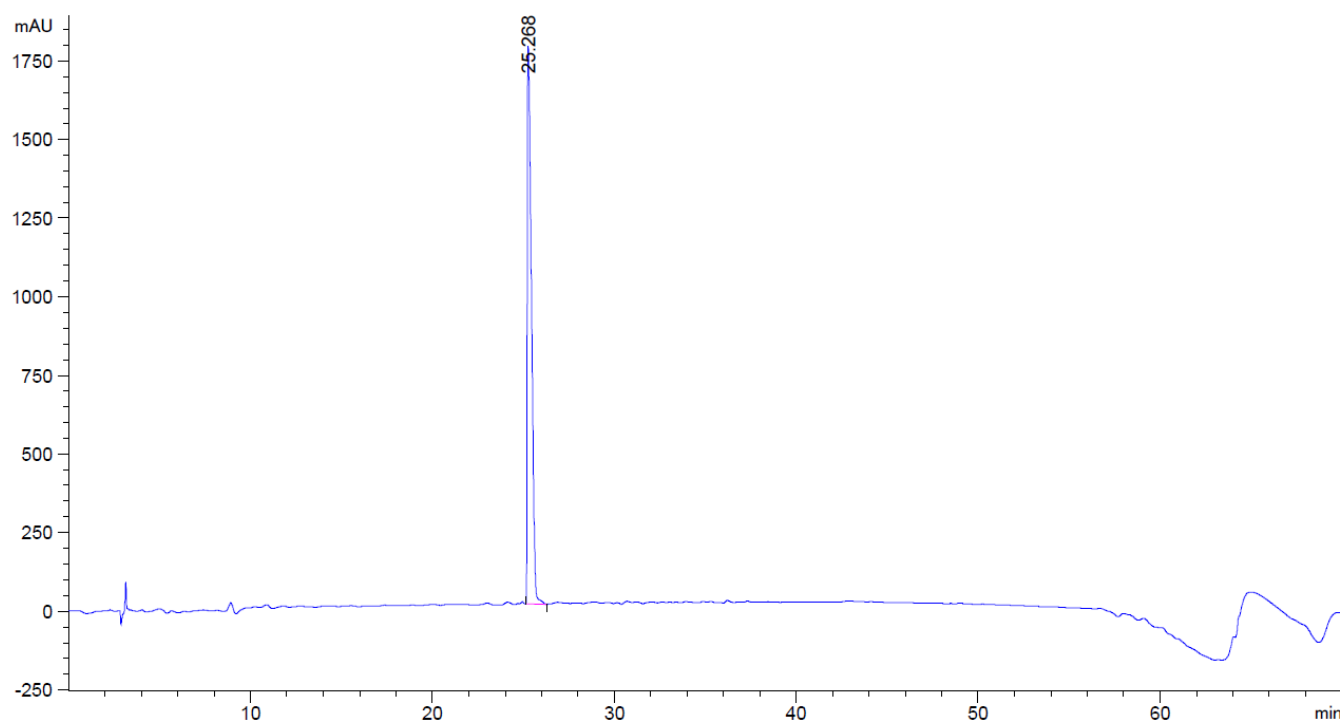
Peptide 22 :



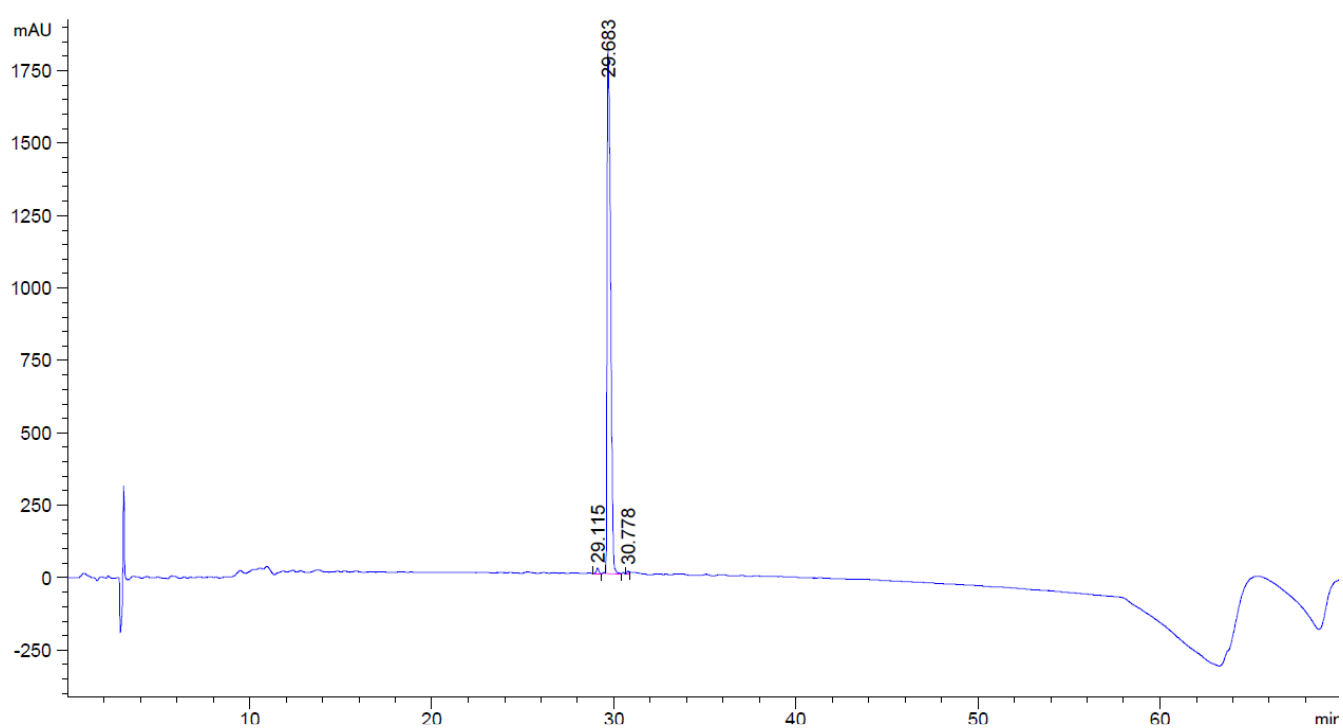
Peptide 23 :



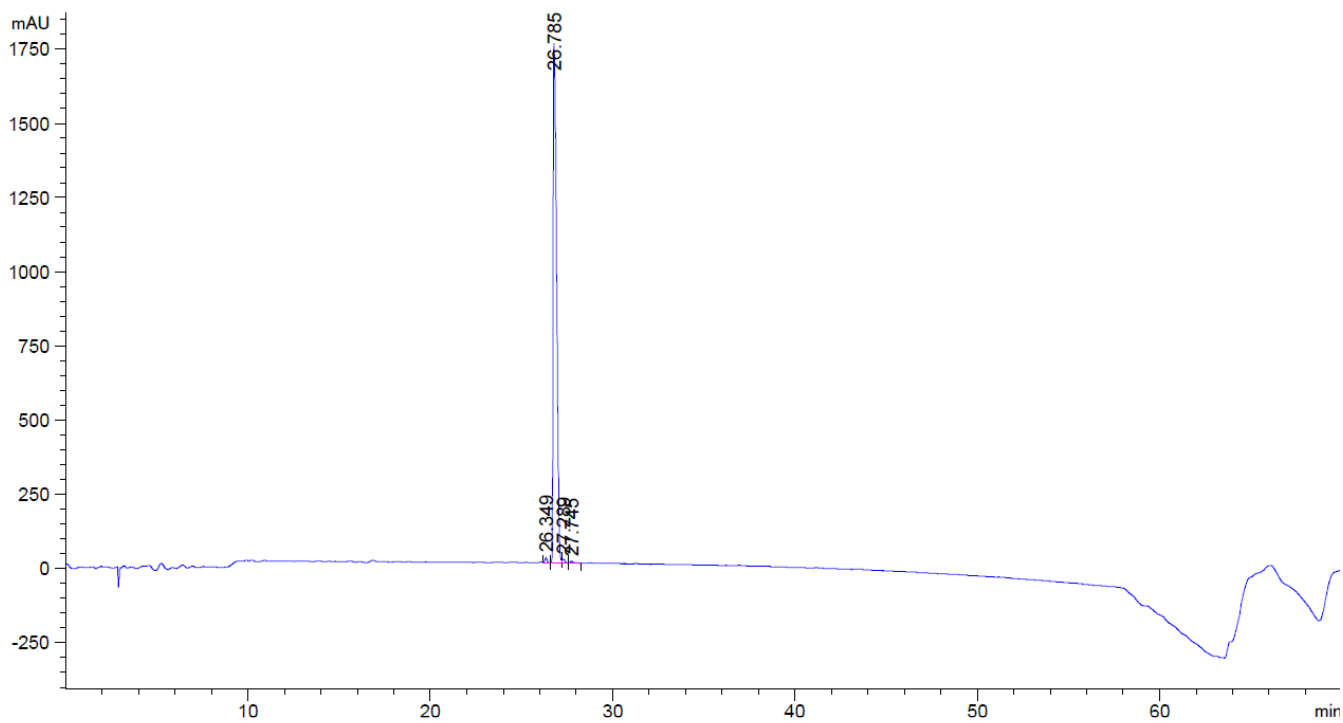
Peptide 24 :



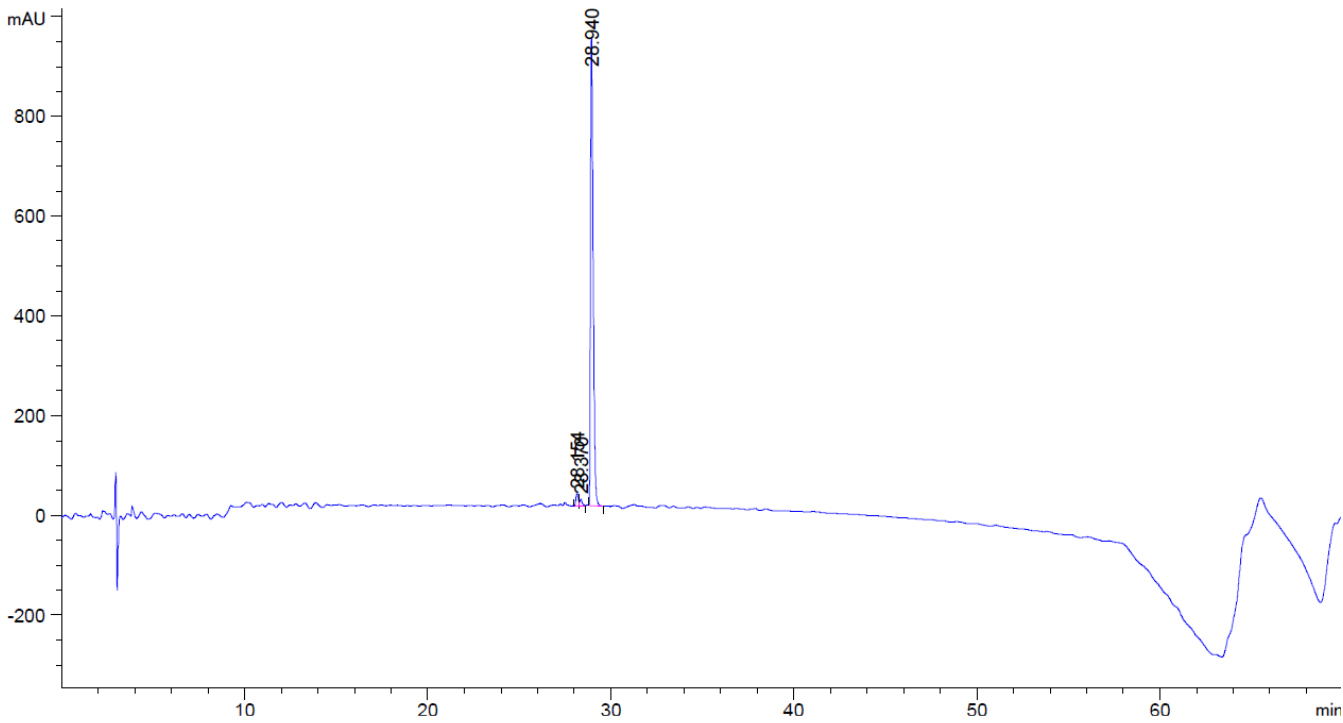
Peptide 25 :



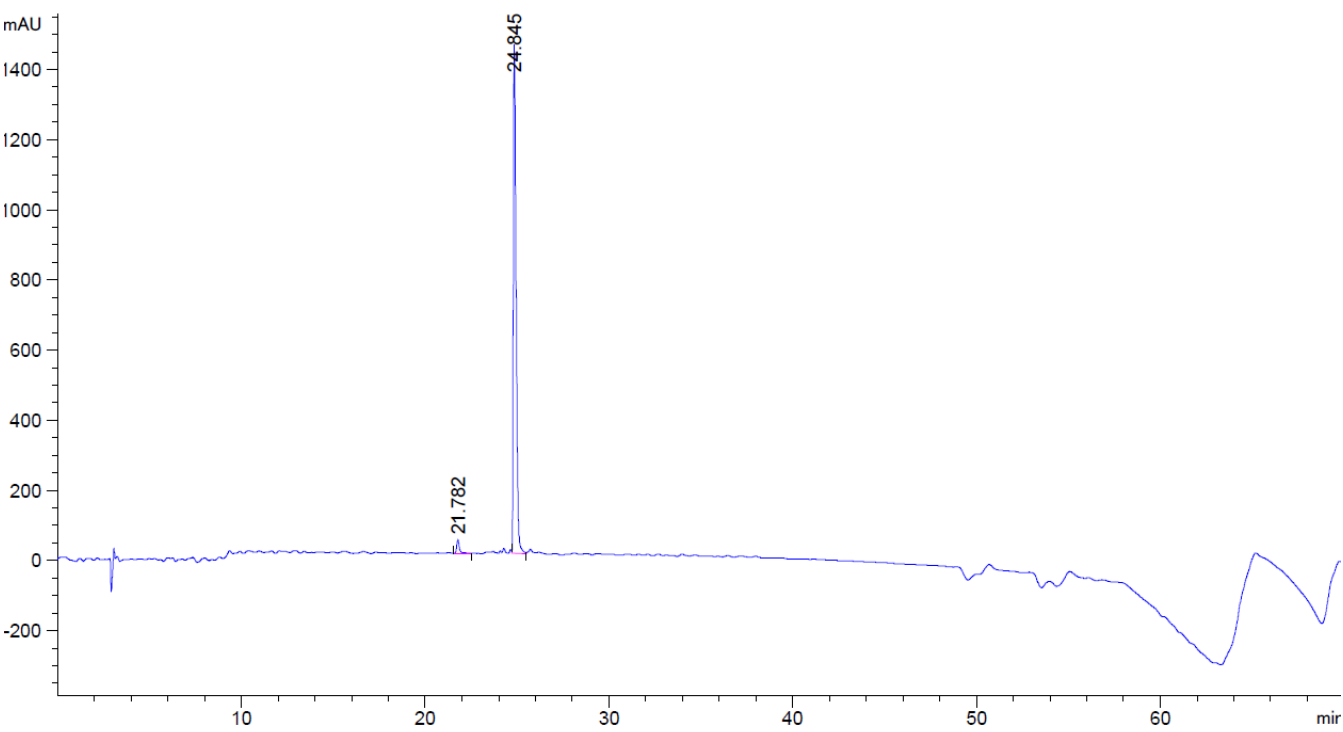
Peptide 26 :



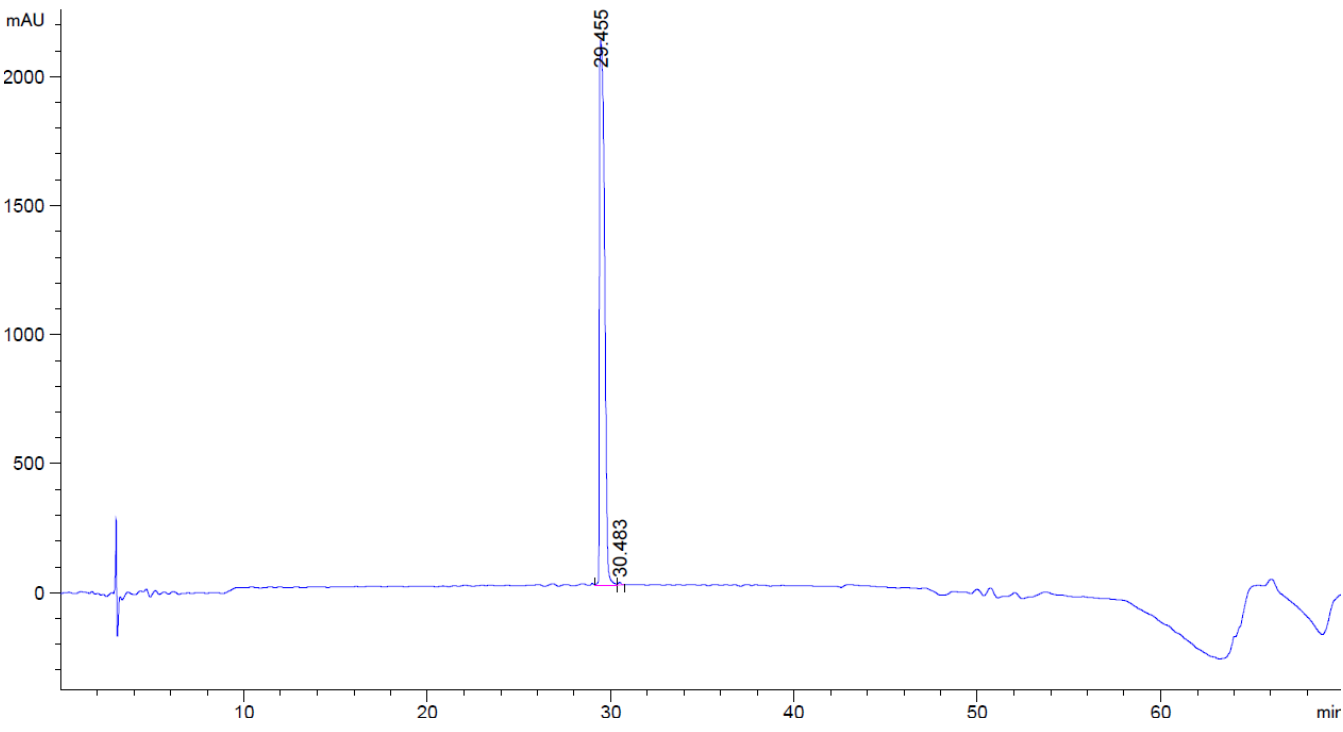
Peptide 27 :



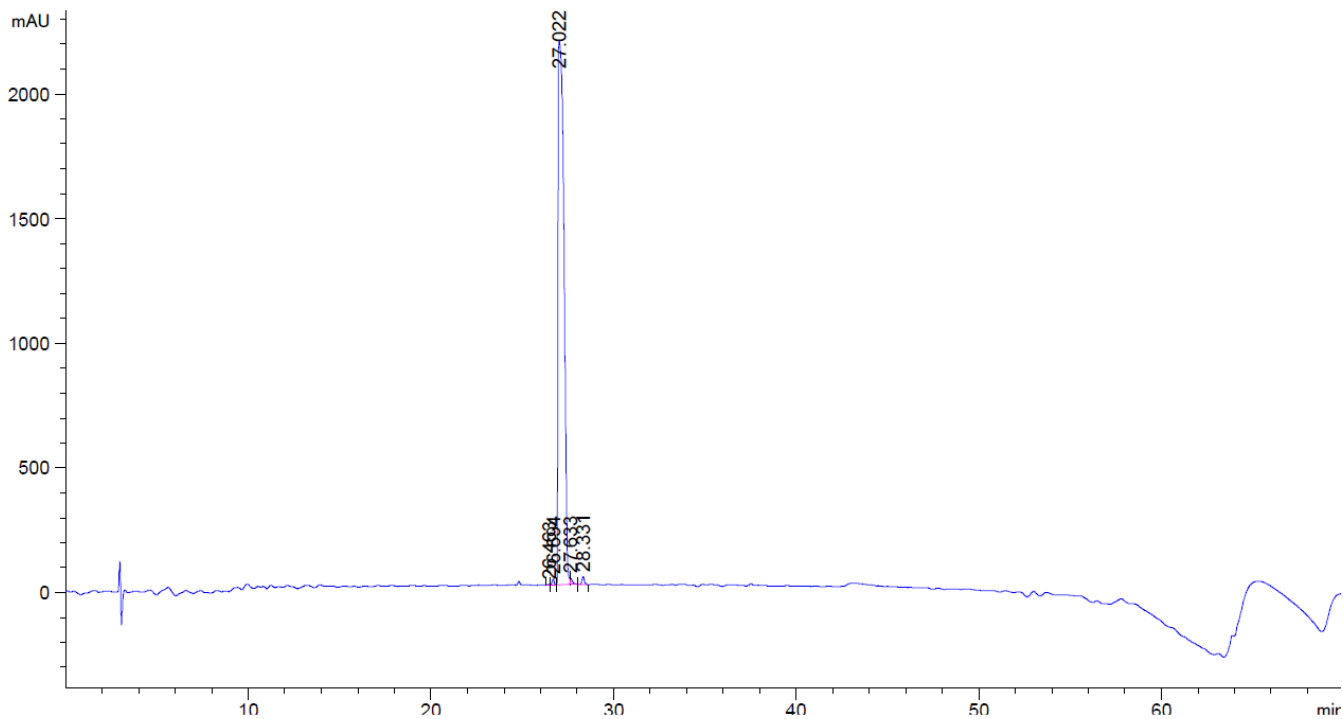
Peptide 28 :



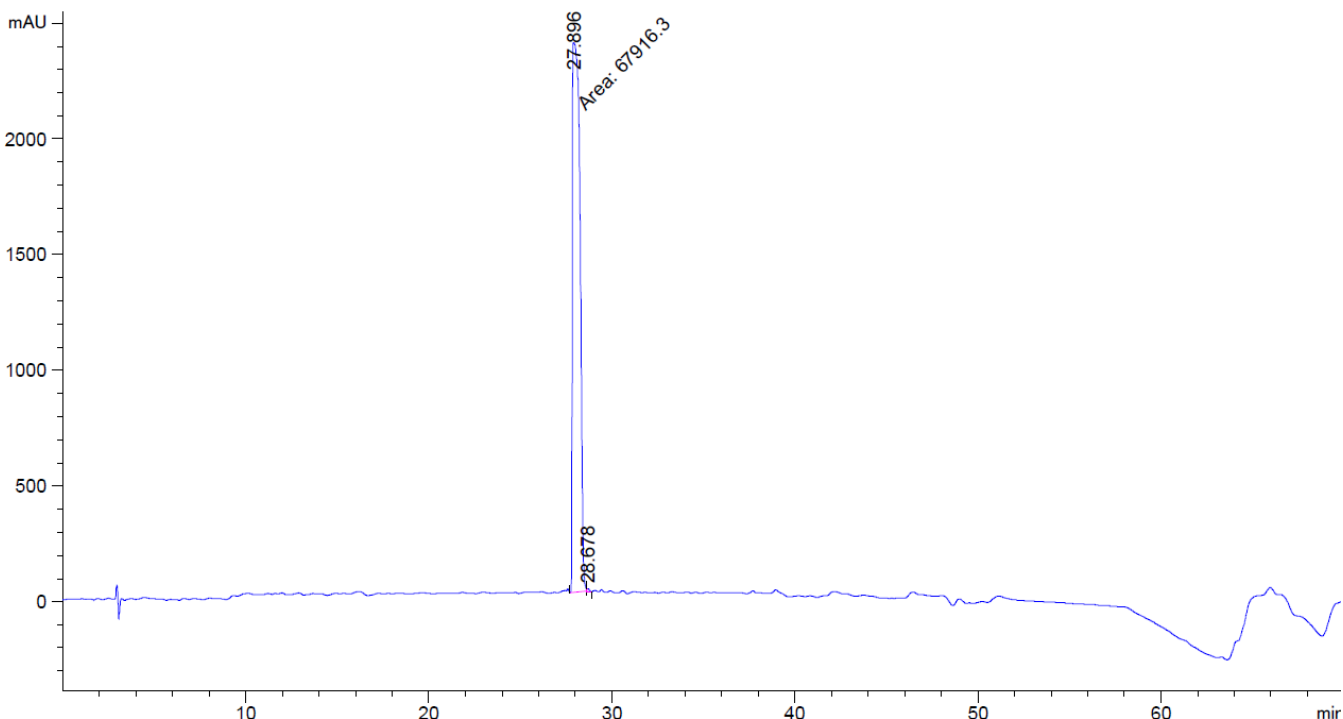
Peptide 29 :



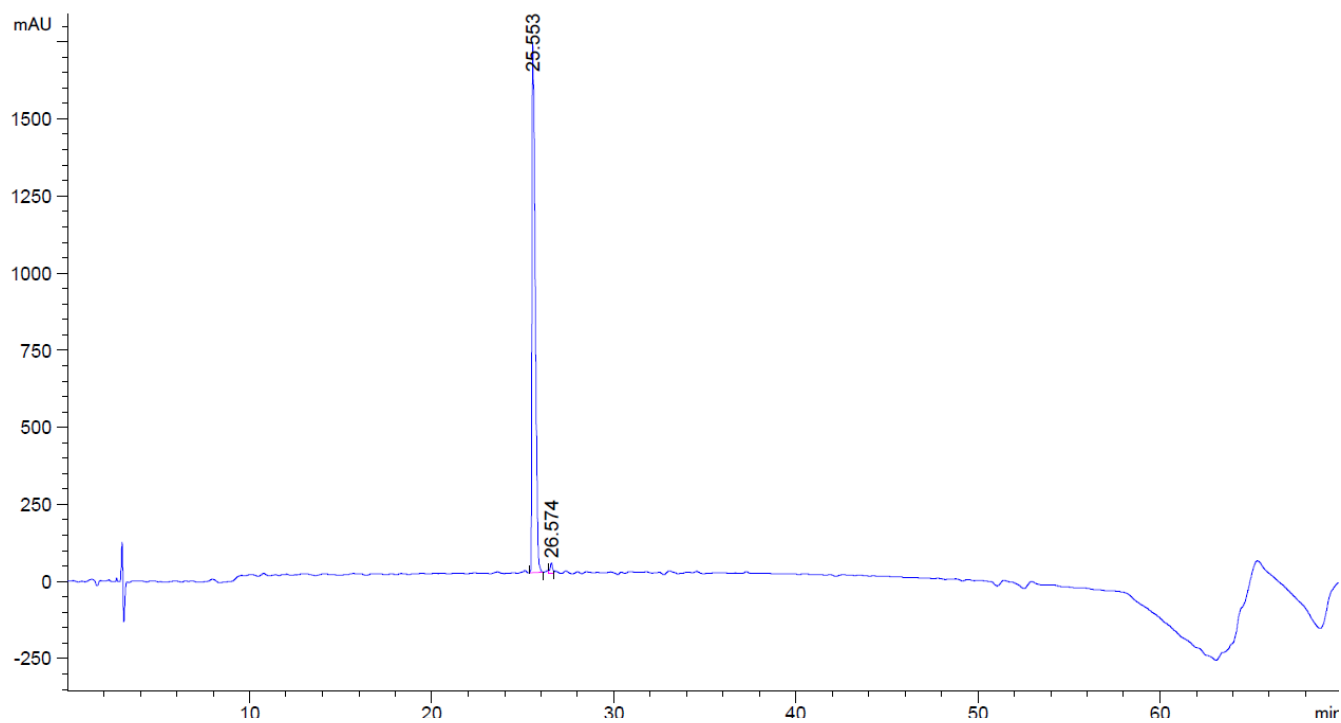
Peptide 30 :



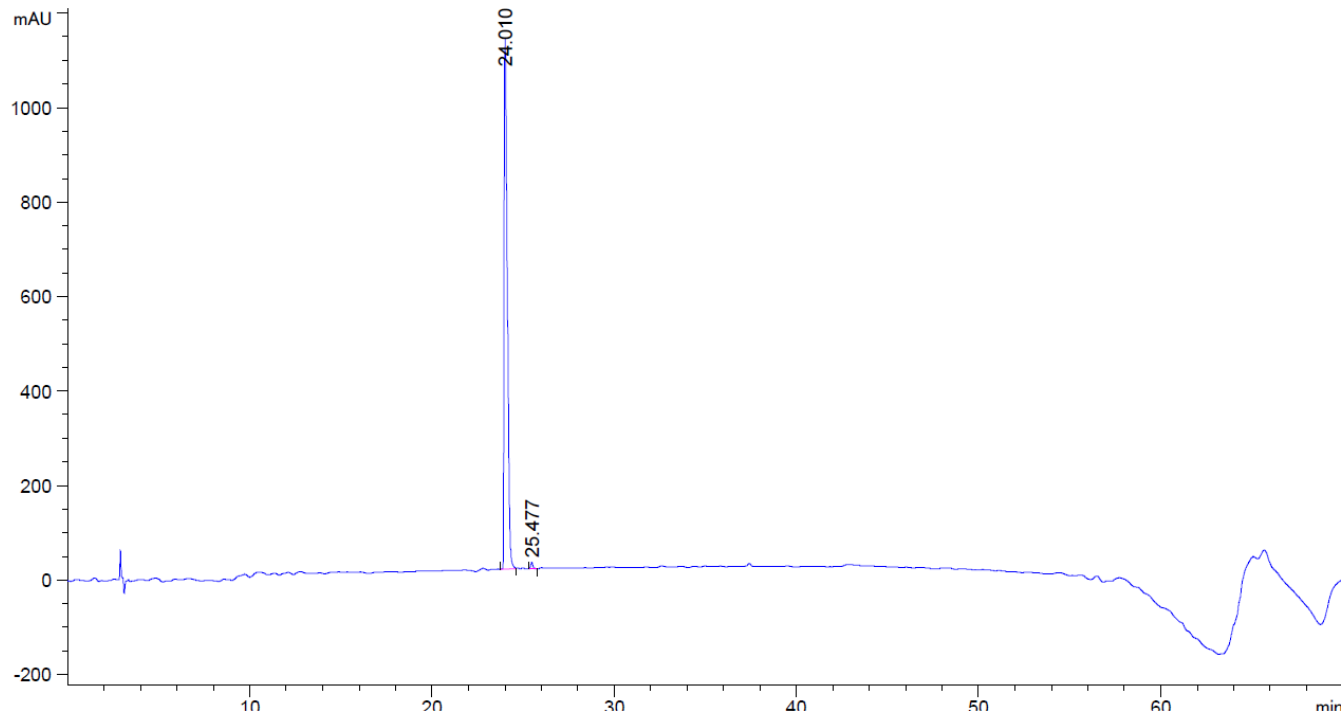
Peptide 31 :



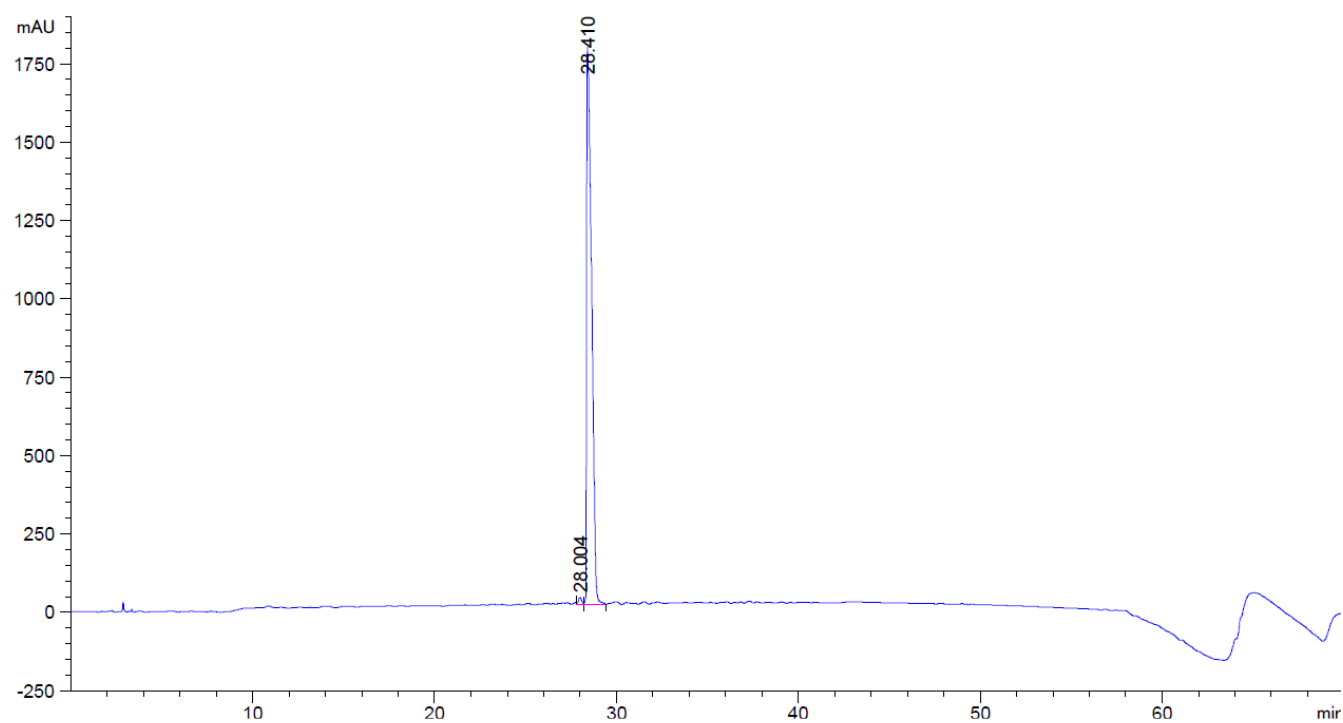
Peptide 32 :



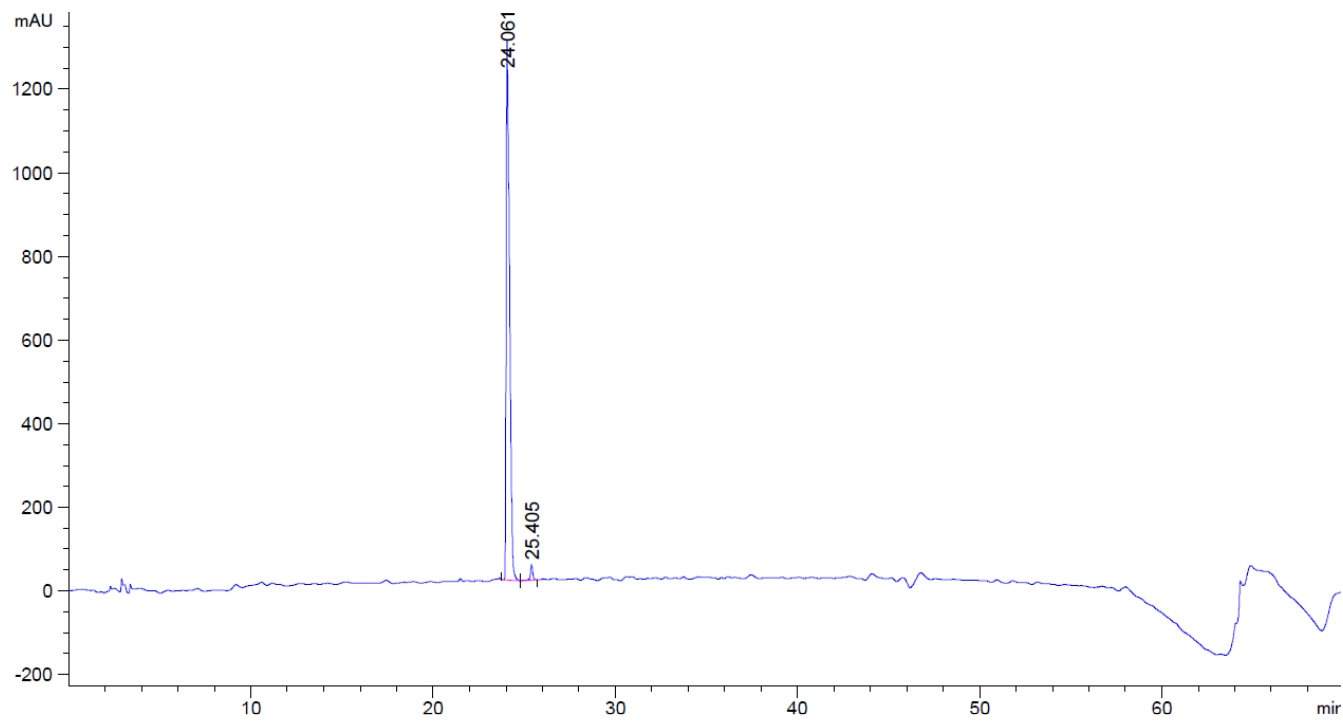
Peptide 33 :



Peptide 34 :



Peptide 35 :



Peptide 36 :

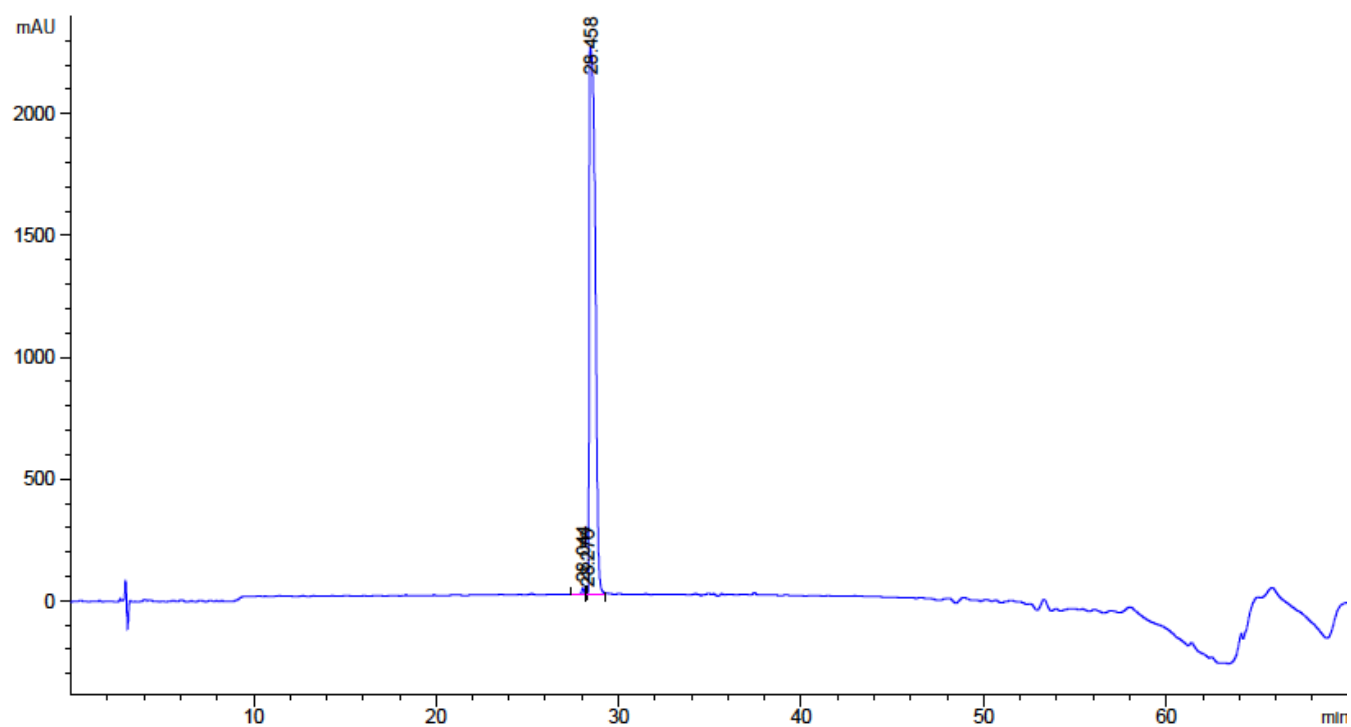
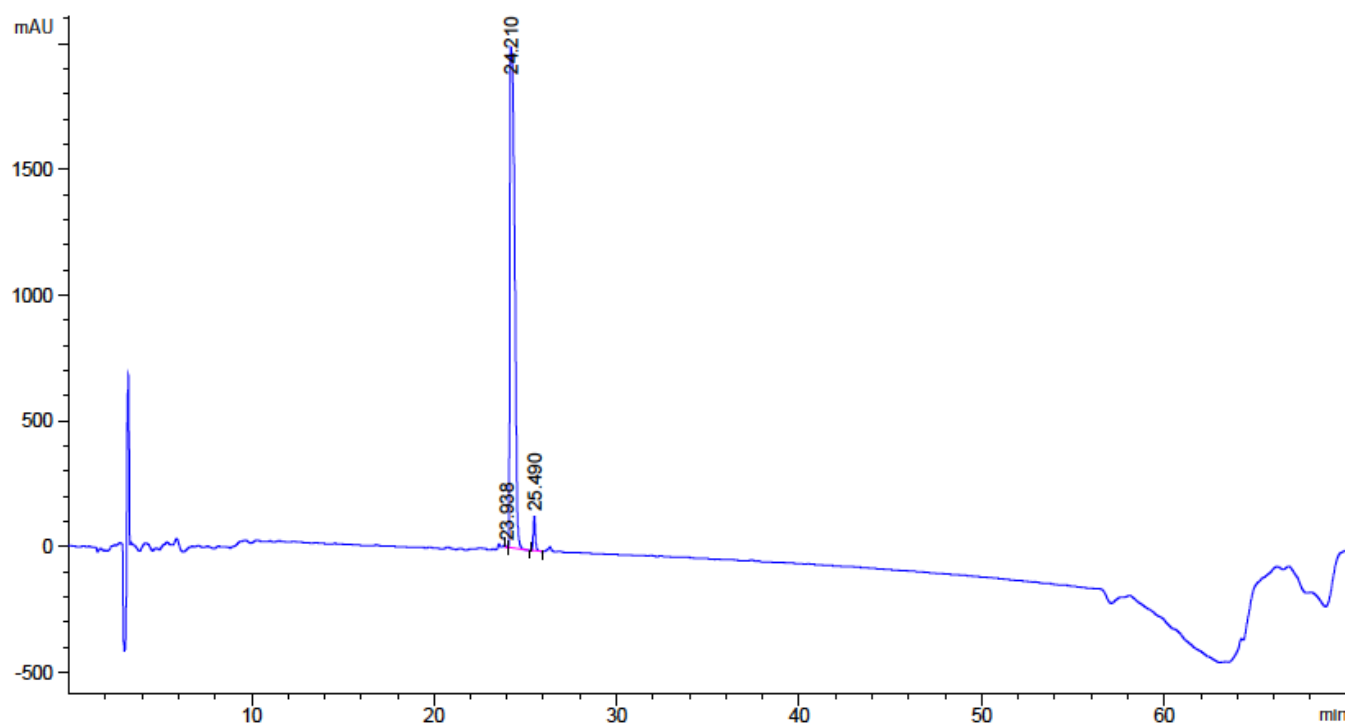


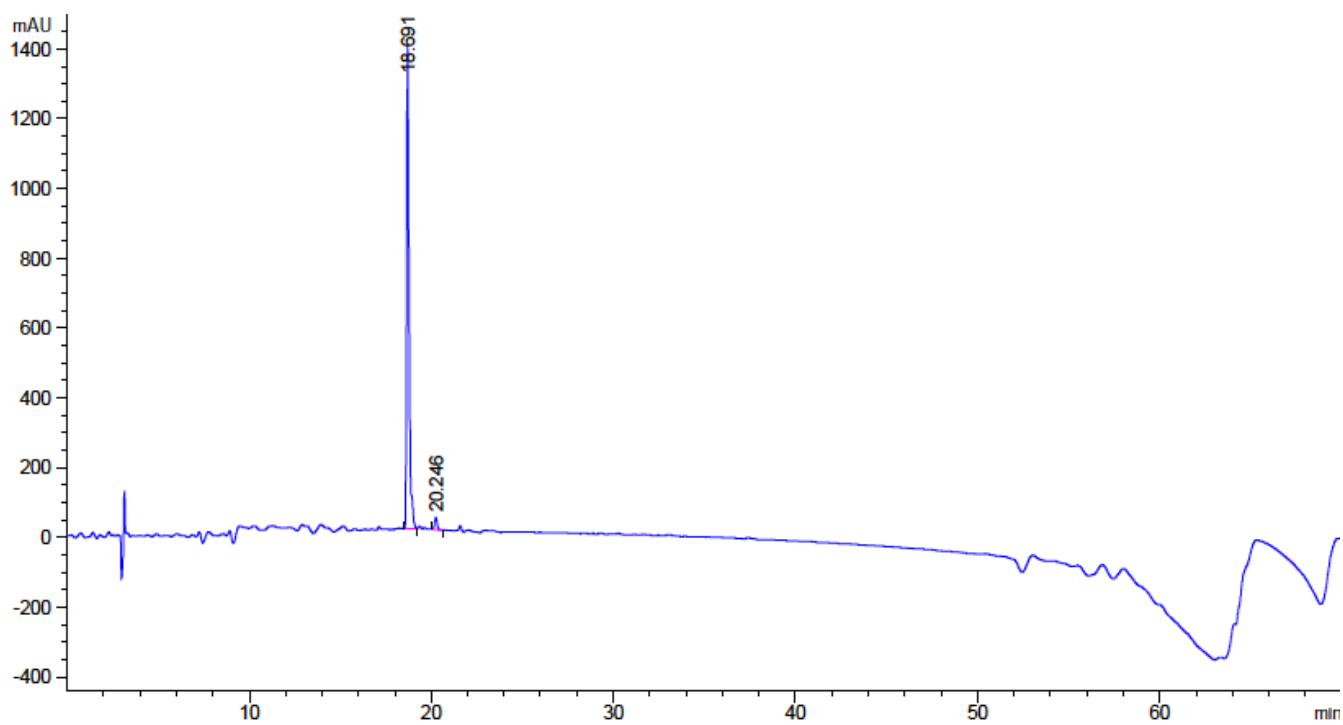
Tableau A3.3. HPLC des peptides 40-43 et 45.

Entrée	Pureté (%)	Temps de rétention (min)
40	97	24,21
41	97	18,69
42	96	13,70
43	99	26,19
45	96	12,69

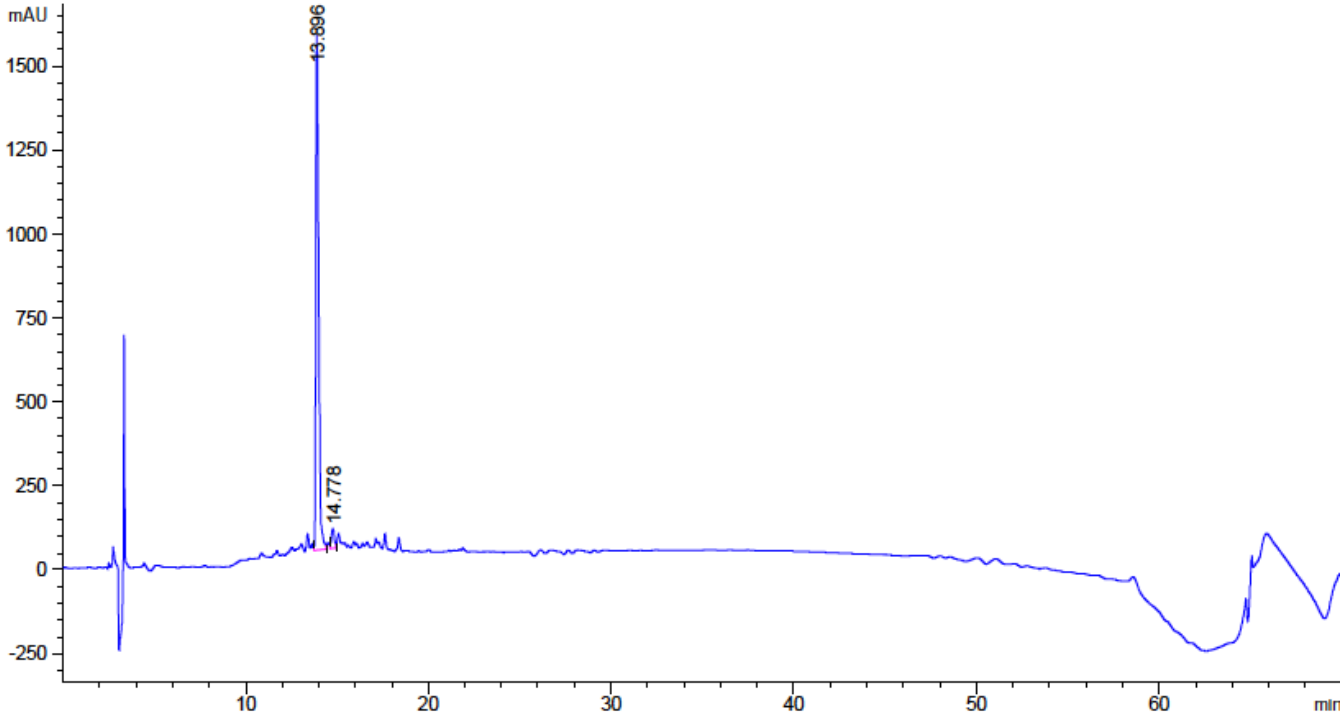
Peptide 40 :



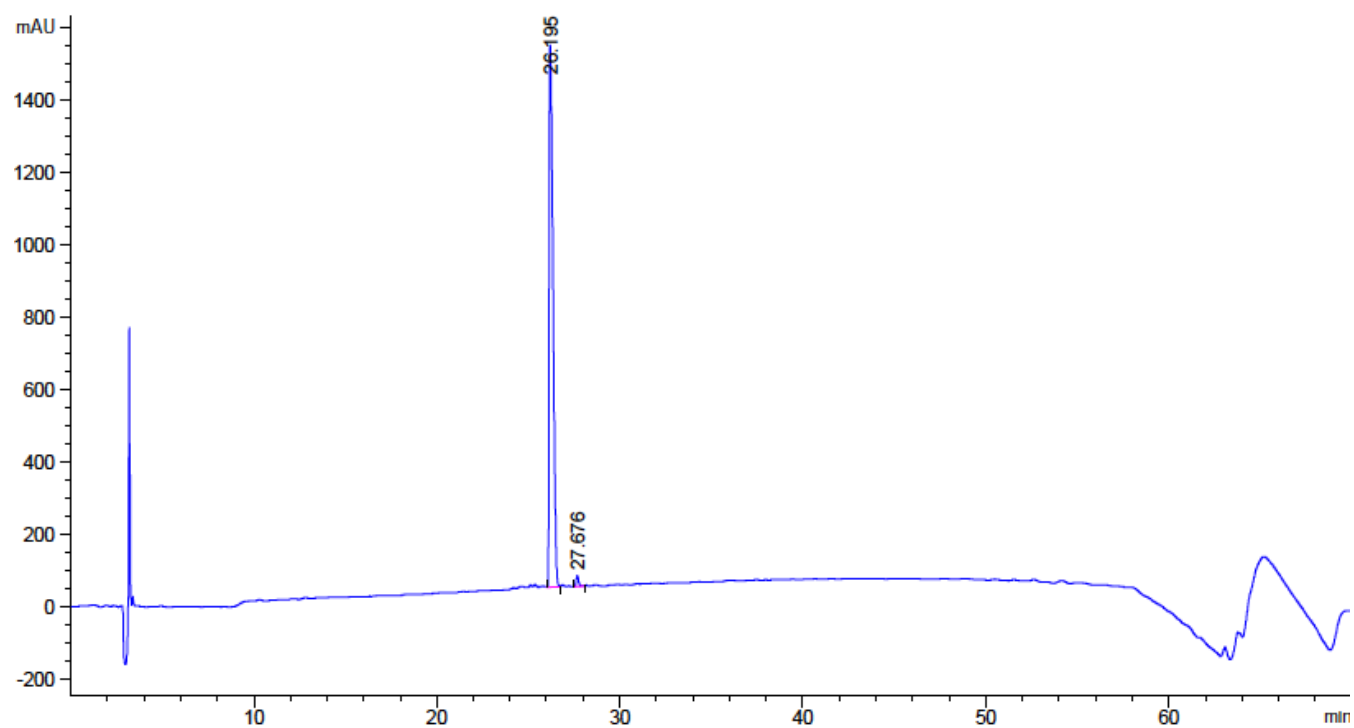
Peptide 41 :



Peptide 42 :



Peptide 43 :



Peptide 45 :

